

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**MAÍRA ASSUNÇÃO BICCA**

**PAPEL DO RECEPTOR B<sub>2</sub> PARA AS CININAS NA  
NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA PELO  
PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE**

**FLORIANÓPOLIS 2012**



MAÍRA ASSUNÇÃO BICCA

**PAPEL DO RECEPTOR B<sub>2</sub> PARA AS CININAS NA  
NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA PELO  
PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.  
Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

**FLORIANÓPOLIS – SC  
2012**

---

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

B583p Bicca, Maíra Assunção

Papel do receptor B2 para as cininas na neuroinflamação induzida pelo peptídeo beta-amilóide [dissertação] / Maíra Assunção Bicca ; orientador, João Batista Calixto. - Florianópolis, SC, 2012.

126 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Peptídeos. 3. Alzheimer, Doença de. 4. Cininas. I. Calixto, João Batista. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 615

Maíra Assunção Bicca. **Papel do Receptor B<sub>2</sub> para as cininas na neuroinflamação induzida pelo peptídeo beta-amiloide.** Florianópolis, 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC.

Orientador: João Batista Calixto

Defesa: 14/02/2012

O objetivo do presente estudo foi investigar o papel do receptor B<sub>2</sub> para as cininas na neuroinflamação induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos. Há indícios de que o peptídeo A $\beta$  tem um papel central na doença de Alzheimer e, de relevância para este trabalho, estudos recentes sugeriram o envolvimento do sistema caliceína-cininas na fisiopatologia da doença em humanos, bem como sua contribuição em modelos experimentais desta doença. Para a realização dos experimentos, os animais foram tratados previamente com o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub> para as cininas, o HOE 140 (50 pmol/sítio/ i.c.v.), 2 horas antes da injeção i.c.v do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/sítio). Após 14 dias, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e no dia seguinte (dia 15), os cérebros foram removidos para a realização da técnica de western blot. Ainda, o mesmo protocolo de tratamento foi seguido para a realização de coletas em tempos específicos (6h, 24h ou 8 dias) para a realização das análises de imunistoquímica, nos tempos de expressão máximo da cada proteína, 6 h para p-JNK e p-ERK, 24 h para COX-2 e Iba-1, e 8 dias para iNOS, nNOS e sinaptofisina. O pré-tratamento dos animais com HOE 140 preveniu o prejuízo cognitivo e o dano sináptico induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>, avaliados pelo teste do reconhecimento de objetos e pela expressão das proteínas sinápticas sinaptofisina e PSD-95, respectivamente. Além disso, o peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> induziu aumento na expressão do receptor B<sub>2</sub> após 15 dias no hipocampo dos animais, e o bloqueio deste receptor com o HOE 140 preveniu esta alteração, sugerindo uma possível auto-regulação do receptor B<sub>2</sub> pelo seu antagonista. Ainda, o processo inflamatório induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>, evidenciado através do aumento da ativação microglial e do aumento na expressão das enzimas COX-2, iNOS e nNOS, foi prevenido pelo tratamento prévio com o HOE 140. Estes efeitos tóxicos iniciados pela administração de A $\beta$ <sub>1-40</sub> parecem ser mediados pela ativação de PKC (isoformas  $\epsilon$  e  $\delta$ ) e, por conseguinte, das MAPKs p-38 e JNK, e dos fatores de transcrição NF $\kappa$ B e c-jun. Estes eventos parecem ser modulados pela ativação do receptor B<sub>2</sub>, uma vez que, o bloqueio deste receptor com o HOE 140 preveniu todas estas alterações induzidas pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Estes resultados, analisados em conjunto, fornecem evidências de que a toxicidade induzida por A $\beta$ <sub>1-40</sub> parece ser mediada pela ativação do receptor B<sub>2</sub> e que o bloqueio deste receptor e das vias de sinalização por ele ativadas podem ser novos alvos para o tratamento do processo inflamatório característico na progressão da doença de Alzheimer.

Palavras-chave: peptídeo  $\beta$ -amiloide; neuroinflamação; Doença de Alzheimer; receptor B<sub>2</sub>; cininas;



## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor João Batista Calixto, pela oportunidade de crescer como cientista e como pessoa, pelos ensinamentos para a ciência e para vida, pela orientação e pelos anos de dedicação a mim concedidos.

A minha mãe Vera Lúcia Mendes Assunção, pelo amor incondicional e pelo exemplo de vida, pelo incentivo em todos os momentos importantes da vida, desde o primeiro passo, passando pelos primeiros discos e livros até o momento de seguir a carreira acadêmica. Meu modelo de professora ideal e que me inspira a me tornar uma professora respeitável, espero que a aluna supere a mestre.

Ao meu pai Jeferson Soares Bicca, pelo amor, carinho, dedicação e empenho em todas as fases da minha vida, pelo exemplo de coragem e dignidade, pelas horas de paciência e por sempre estar ao meu lado. Por dar asas aos meus sonhos.

Ao meu irmão Saul Assunção Bicca, por me ensinar, sem querer, a compartilhar e dividir, por representar o meu outro eu e por me acompanhar durante a minha jornada.

Ao meu namorado Yuri Assunção Joaquim, que está ao meu lado efetivamente em todos os momentos difíceis e alegres, que me dosa com sua paciência e me ensina a “falar menos”. Pelo amor, amizade, companheirismo e parceria.

Aos meus sogros Baldonado Alves Joaquim e Maria Aparecida Assunção Joaquim, por serem meus pais, meus tios, meus amigos, meus conselheiros, meu porto seguro. Pela convivência e ensinamentos constantes.

Aos meus cunhados Alex e Scheila, pela devoção, incentivo e força durante todo o caminho.

A minha avó Hilda Soares Bicca, pelo exemplo de vida, de perspicácia, de força de vontade, de educadora. Pelo imensurável esforço durante toda minha caminhada.

A toda minha família que de alguma maneira fez parte do que sou hoje e que torce por mim a cada desafio.

Aos meus pais científicos Rodrigo Medeiros e Gizelle Fazzioni Passos, por me apresentarem a carreira científica e o peptídeo  $\beta$ -amilóide. Por me guiarem nos momentos decisivos, por puxarem as minhas orelhas e por todas as alegrias que passamos juntos aqui no Brasil ou nos Estados Unidos.

A Professora Cláudia Pinto Figueiredo, que conheci doutoranda, e que compartilhou comigo todo o seu conhecimento e que me auxiliou durante toda a jornada científica.

A Doutora Gecioni Loch-Neckel, pela amizade, cumplicidade e parceria, tanto na vida quanto na ciência.

Ao Robson da Costa, pela dedicação e ensinamentos nos momentos finais e decisivos da dissertação, por não me poupar da verdade e, contudo, ainda me fazer rir.

A Marianne, Fabiana, Edinéia e Juliana Chaves, por vivenciarem comigo todas as experiências no laboratório, pelos cafés, pelas risadas, pela discussão científica e pelo grande aprendizado. Nós somos “a raspa do tacho”.

Aos todos os colegas do LAFEX, os que ainda permanecem, os que me viram chegar, os que eu vi chegar e também os que vi partir, pela convivência e grande aprendizado. A Maíra Cola, Daniela Leite, Alice Vianna, Kathryn Bortolini, Juliana Fabris, Ana Flávia Pazcuck, Eliziane Patrício, Kellen Rebelo, Raquel Schwanke, Fernanda. Ao Emerson, Jarbas, Rodrigo Marcon, Rafael Dutra, Alisson Bento, Andrey, Luciano Batista e Eduardo Simão.



Ao todos os integrantes do LabThê. A Evelyn, Claudini, Renata, Nayana, ao Gilli, Leo, Alexandre, Marcelo e é claro a Professora Thereza Lima.

A Ana Paula Ramos Costa, minha colega de mestrado e minha amiga das horas sem noção. Por termos nos achado durante este processo, por sermos tão parecidas e tão convictas das nossas idéias.

A todos os alunos da minha turma de mestrado. Em especial a Ana Carolina Vanvossen, Lara Cleme de Assis, Mariane Roman e Muryel Gonçalves.

Aos todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, pela contribuição a minha formação e engrandecimento pessoal e profissional.

A todos os colegas do Departamento de Farmacologia, doutores, doutorandos, mestres, metrandos, ICs, técnicos, estagiários, secretárias, faxineiras, seguranças, pelas conversas nos corredores, pelas horas de alegria e de desabafo.

Aos funcionários do LAFEX, Patrícia Vianna, Juliana Gonçalves, Aline Venâncio e Pedro, pelo suporte técnico e dedicação durante estes anos.

Aos Professores Hudson Buck, Jamil Assreuy e Tania Frode por terem aceitado avaliar este trabalho na defesa desta dissertação.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro.



*“É fazendo que se aprende a fazer  
aquilo que se deve aprender a fazer.”*

***Aristóteles***



## **RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi investigar o papel do receptor  $B_2$  para as cininas na neuroinflamação induzida pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos. Há indícios de que o peptídeo  $A\beta$  tem um papel central na doença de Alzheimer e, de relevância para este trabalho, estudos recentes sugeriram o envolvimento do sistema caliceína-cininas na patofisiologia da doença em humanos, bem como sua contribuição em modelos experimentais desta doença. Para a realização dos experimentos, os animais foram pré-tratados com o antagonista seletivo do receptor  $B_2$ , o HOE 140 (50 pmol/sítio/ i.c.v.), 2 horas antes da injeção i.c.v do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/sítio). Após 14 dias, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e no dia seguinte (dia 15), os cérebros foram removidos para a realização da técnica de western blot. Ainda, o mesmo protocolo de tratamento foi seguido para a realização de coletas em tempos específicos (6h, 24h ou 8 dias) para a realização das análises de imunistoquímica, nos tempos de expressão máximo da cada proteína. O pré-tratamento dos animais com HOE 140 preveniu o prejuízo cognitivo e o dano sináptico induzido pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , avaliados através do teste de reconhecimento de objetos e pela expressão das proteínas sinápticas sinaptofisina e PSD-95, respectivamente. Além disso, o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  induziu aumento na expressão do receptor  $B_2$  após 15 dias no hipocampo dos animais, e o bloqueio deste receptor com o HOE 140 preveniu esta alteração, sugerindo uma possível auto-regulação do receptor  $B_2$  pelo seu antagonista. Ainda, o processo inflamatório induzido pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , evidenciado através do aumento da ativação microglial e do aumento na expressão das enzimas COX-2, iNOS e nNOS, foi prevenido pelo pré-tratamento com o HOE 140. Estes efeitos tóxicos iniciados pela administração de  $A\beta_{1-40}$  parecem ser mediados pela ativação de PKC (isoformas  $\epsilon$  e  $\delta$ ) e, por conseguinte, das MAPKs p-38 e JNK, e dos fatores de transcrição NF $\kappa$ B e c-jun. Estes eventos parecem ser modulados pela ativação do receptor  $B_2$ , uma vez que, o bloqueio deste receptor com o HOE 140 preveniu todas estas alterações induzidas pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . Estes resultados, analisados em conjunto, fornecem evidências de que a toxicidade induzida por  $A\beta_{1-40}$  parece ser mediada pela ativação do receptor  $B_2$  e que o bloqueio deste receptor e das vias de sinalização por ele ativadas podem ser novos alvos para o tratamento do processo inflamatório característico na progressão da doença de Alzheimer.



## **ABSTRACT**

The aim of this study was to investigate the role of the kinin B<sub>2</sub> receptor in the A $\beta$ -induced neuroinflammation in mice. There are recent evidences showing that the A $\beta$  peptide has a central role in Alzheimer's disease. Relevantly, recent studies have suggested the involvement of the kallikrein-kinin system in the pathophysiology of Alzheimer's disease in both humans and experimental models. In this study, experimental procedures were carried out using *Swiss* mice pretreated with the selective B<sub>2</sub> receptor antagonist, HOE 140 (50 pmol/site, i.c.v.), given two hours prior the i.c.v. injection of A $\beta$ <sub>1-40</sub> peptide (400 pmol/site). After 14 days, the animals were subjected to behavioral tests, and on day 15 the brains were removed to perform Western blot analysis. In addition, the same treatment protocol was used to carry out tissue collections, at specific time points (6h, 24h or 8 days), in order to perform immunohistochemical analysis. These time point were chosen based on the maximum expression level of each protein. The pretreatment of animals with HOE 140 prevented the cognitive impairment and synaptic injury induced by A $\beta$ <sub>1-40</sub> peptide, assessed using object recognition task and through evaluation of the expression of synaptic proteins, (synaptophysin and PSD-95), respectively. Furthermore, A $\beta$ <sub>1-40</sub> peptide increased B<sub>2</sub> receptor expression, in the mice hippocampus after 15 days, and the pharmacological blockage of this receptor (with HOE 140) prevented this alteration, suggesting a possible auto-regulation mechanism for B<sub>2</sub> receptor expression. Also, the A $\beta$ <sub>1-40</sub>-induced inflammatory process was evidenced by increased microglial activation and increased expression of COX-2, iNOS and nNOS. All these alterations were prevented by the pretreatment with HOE 140. The toxic effects induced by A $\beta$ <sub>1-40</sub> administration seems to be mediated by activation of PKC ( $\delta$  and  $\epsilon$  isoforms), which leads to the activation of p-38 MAPKs and JNK, and transcription factors NF $\kappa$ B and c-Jun. These events seems to be modulated by activation of B<sub>2</sub> receptor, since blocking this receptor with HOE 140 prevented all these changes. These results, taken together, provide evidence that the A $\beta$ -induced toxicity might be mediated by B<sub>2</sub> receptor activation. Thus, the blockage of B<sub>2</sub> receptor, and signaling pathways activated by it, might constitute new attractive targets for the treatment of the inflammation associated with of Alzheimer's disease progression.





## ***LISTA DE FIGURAS***

<b>Figura 1</b> - Estados de agregação do peptídeo A $\beta$ .....	31
<b>Figura 2</b> - Esquema usado para a preparação do peptídeo A $\beta_{1-40}$ , incluindo agregação e análises do estado de agregação.....	42
<b>Figura 3</b> - Esquema ilustrando os ventrículos e outras regiões cerebrais (esquerda) e a difusão do corante azul de Evans pelos ventrículos (direita).....	45
<b>Figura 4</b> - Imagens representativas do local de inserção da agulha e o traço da agulha até o ventrículo.....	45
<b>Figura 5</b> - Esquema representativo das etapas do teste de reconhecimento de objetos.....	48
<b>Figura 6</b> - Esquema representativo do protocolo experimental adotado no estudo.....	56
<b>Figura 7</b> - Esquema representativo do protocolo experimental adicional adotado no estudo.....	57
<b>Figura 8</b> - Confirmação do estado de agregação do peptídeo A $\beta_{1-40}$ .....	61
<b>Figura 9</b> - O bloqueio do receptor B <sub>2</sub> previne o déficit cognitivo induzido pela administração i.c.v. do peptídeo A $\beta_{1-40}$ em camundongos.....	63

**Figura 10** - O tratamento com o antagonista HOE 140 não altera o déficit cognitivo induzido pela administração i.c.v. do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.....64

**Figura 11** - O bloqueio do receptor B<sub>2</sub>, com os diferentes antagonistas, previne o déficit cognitivo induzido pela administração i.c.v. do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.....66

**Figura 12** - O antagonista do receptor B<sub>2</sub>, o HOE 140, modula o aumento da expressão do próprio receptor, induzida pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.....68

**Figura 13** - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor B2 previne a perda sináptica induzida pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.....70

**Figura 14** - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor B2 previne a diminuição na expressão da sinaptofisina induzida pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.....71

**Figura 15** - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor B2 previne a diminuição na expressão da PSD-95 induzida pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.....72

**Figura 16** - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor B2 previne o aumento na ativação de células microgliais induzida pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.....74

**Figura 17** - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor B2 previne o aumento na expressão de células microgliais ativadas induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos.....75

**Figura 18** - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor B2 previne o aumento na expressão da enzima COX-2 induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos.....77

**Figura 19** - O bloqueio do receptor B2 com antagonista seletivo, o HOE 140, previne o aumento na expressão da enzima COX-2 induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos.....78

**Figura 20** - O pré-tratamento com HOE 140 previne o aumento da expressão das enzimas iNOS e nNOS induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos.....80

**Figura 21** - O pré-tratamento com HOE 140 previne o aumento da expressão da proteína JNK fosforilada (P-JNK) induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos.....82

**Figura 22** - O bloqueio do receptor B2 com antagonista seletivo, o HOE 140, previne o aumento da expressão da proteína JNK fosforilada (P-JNK) induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos.....83

**Figura 23** - O pré-tratamento com HOE 140 previne o aumento da fosforilação do c-Jun (P-c-Jun) induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos.....84

**Figura 24** - O pré-tratamento com HOE 140 previne o aumento da expressão da proteína fosforilada p-38 (P-p-38) e p-65 (p-65/NFκ-B) induzido pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.....86

**Figura 25** - O peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> e o antagonista do receptor B2 (HOE 140), não promovem alterações na expressão de ERK fosforilada (P-ERK).....88

**Figura 26** - O pré-tratamento com HOE 140 previne o aumento da expressão das proteínas PKCε e PKCδ induzido pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.....90

**Figura 27** - Mecanismos de ação citotóxica do peptídeo Aβ bloqueados pelo antagonista do receptor B2 o HOE 140.....102

## ***ABREVIATURAS***

**A $\beta$**  -  $\beta$ -amilóide

**ADDLs** - *A $\beta$ -derived diffusible ligands*

**APoE** - Apolipoproteína E

**APP** - Proteína precursora amilóide

**AU** - Acetato de uranila

**BK** - Bradinicina

**B<sub>1</sub>R** - Receptor B<sub>1</sub>

**B<sub>2</sub>R** - Receptor B<sub>2</sub>

**COX-2** - Ciclooxygenase- 2

**DA** - Doença de Alzheimer

**DALBK** - des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina

**E.P.M.** - Erro padrão da média

**ERK** - Quinase regulada por sinal extracelular

**GD** - Giro denteado

**HOE 140** - Antagonista seletivo e não-competitivo do receptor B<sub>2</sub>

**Iba-1** - *Anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1*

**i.c.v.** - intracerebroventricular

**JNK** - Quinase c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal

**iNOS** - Óxido nítrico sintase induzida

**kDa** - Quilodalton

**LPS** - Lipossacarídeo

**LTP** - Potenciação de longo prazo

**MAPK** - Proteínas quinases ativadas por mitógenos

**MET** - Microscopia eletrônica de transmissão

**NF- $\kappa$ B** - Fator nuclear kappa B

**nNOS** - Óxido nítrico sintase neuronal

**NO** - Óxido nítrico

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Anion superóxido

**PBS** - Tampão fosfato

**PKC** - Proteína quinase C

**PSD-95** - Domínio pós-sináptico 95

**PSEN** - Presenilina

**RNA** - Ácido ribonucleico

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio

**SNC** - Sistema nervoso central

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<i>1</i>	<i>INTRODUÇÃO</i> .....	27
1.1	Doença de Alzheimer .....	27
1.2	Peptídeos A $\beta$ .....	30
1.3	Neuroinflamação .....	33
1.4	Cininas .....	35
1.5	Cininas e Doença de Alzheimer .....	36
1.6	Justificativa.....	37
<i>2</i>	<i>OBJETIVOS</i> .....	38
2.1	Objetivo geral .....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
<i>3</i>	<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i> .....	40
3.1	Animais.....	40
3.2	Agregação do peptídeo $\beta$ -amilóide.....	40
3.3	Verificação do estado de oligomerização/agregação do peptídeo $\beta$ -amilóide .....	41
3.3.1	<i>Eletroforese em gel nativo de poliacrilamida</i> .....	42
3.3.2	<i>Cromatografia de exclusão por tamanho</i> .....	43
3.3.3	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i> .....	43
3.4	Administração intracerebroventricular do peptídeo $\beta$ -amilóide .....	44

3.5	Tratamento farmacológico .....	46
3.6	Testes comportamentais .....	47
3.6.1	<i>Reconhecimento de Objetos</i> .....	47
3.7	Coleta de tecidos para a realização dos experimentos de western blot e imunoistoquímica.....	49
3.8	Imunodeteção de proteínas por western blot .....	49
3.8.1	<i>Preparação do extrato celular total</i> .....	49
3.8.2	<i>Determinação da concentração de proteínas</i> .....	50
3.8.3	<i>Ensaio de imunodeteção</i> .....	51
3.9	Análise histológica e imunoistoquímica.....	52
3.10	Drogas e reagentes.....	54
3.11	Análise estatística .....	55
3.12	Protocolo Experimental.....	55
4	<b>RESULTADOS</b> .....	59
4.1	Estado de agregação do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	59
4.2	Papel do receptor B <sub>2</sub> para as cininas no prejuízo cognitivo induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	62
4.3	Papel dos diferentes antagonistas do receptor B <sub>2</sub> para as cininas sobre o prejuízo cognitivo induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> . 65	
4.4	Efeito da injeção do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> sobre a expressão do receptor B <sub>2</sub> no cérebro e análise da possível auto-regulação deste receptor.....	67



4.5	Envolvimento do receptor B <sub>2</sub> na disfunção sináptica induzida pelo peptídeo Aβ <sub>1-40</sub> .....	69
4.6	Envolvimento do receptor B <sub>2</sub> no processo inflamatório induzido pelo peptídeo Aβ <sub>1-40</sub> no hipocampo de camundongos....	73
4.7	Participação do receptor B <sub>2</sub> no aumento da expressão das enzimas produtoras de NO induzido pelo peptídeo Aβ <sub>1-40</sub> no hipocampo de camundongos. ....	79
4.8	Caracterização do envolvimento do receptor B <sub>2</sub> na ativação das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKS) e suas vias de sinalização na neuroinflamação induzida pelo peptídeo Aβ <sub>1-40</sub> . 81	
4.9	Participação do receptor B <sub>2</sub> e de diferentes isoformas da proteína quinase C (PKC) nas vias de sinalização intracelular envolvidas na toxicidade induzida por Aβ <sub>1-40</sub> . ....	89
5	<i>DISCUSSÃO</i> .....	91
6	<i>SUMÁRIO</i> .....	103
7	<i>CONCLUSÕES</i> .....	105
8	<i>ANEXOS</i> .....	107
9	<i>REFERÊNCIAS</i> .....	109



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) atualmente não tem cura e progride de forma irreversível, a idade é o principal fator de risco para a doença, sendo que a partir dos 65 anos o risco dobra a cada 5 anos (MOUNT e DOWNTON, 2006). No Brasil, não existem dados precisos sobre o número de pessoas acometidas pela doença, no entanto, sabe-se que no ano de 2010 o número de indivíduos com 65 anos de idade ou mais foi de aproximadamente 11,5 milhões (IBGE, 2011). A maior preocupação em relação à idade se deve ao fato de que a característica clínica proeminente da DA é sua progressão ao longo do tempo. Inicialmente, ocorre prejuízo do aprendizado e memória de curto prazo, sem alteração em outras funções cognitivas. Em seguida, são observadas mudanças na memória de longo prazo, orientação e funções executivas como concentração e planejamento. Também podem ocorrer alterações na personalidade e no comportamento, tais como irritabilidade, ansiedade, agitação ou mesmo alucinações. Com a progressão da doença, é observada a deterioração da linguagem, habilidades visuais e função motora (TERI et al., 1989; PETRELLA, COLEMAN e DORAISWAMY, 2003; WALSH e SELKOE, 2004).

A susceptibilidade dos indivíduos à DA é multifatorial, ou seja, resultante de múltiplos fatores ambientais e genéticos (MATTSON, 2004; SELKOE, 2011). Além do envelhecimento, que constitui o principal fator de risco relacionado à doença, outros fatores têm sido sugeridos com base em estudos epidemiológicos. Dentre estes, pode-se destacar baixa escolaridade, traumatismo craniano associado à perda de consciência, sexo feminino, depressão, diabetes melitus, hipertensão arterial, tabagismo, hiperinsulinemia, sedentarismo, fibrilação arterial, além de fatores nutricionais e genéticos (COTMAN e BERCHTOLD, 2002; RITCHIE e LOVESTONE, 2002; GORELICK, 2004; LUCHSINGER e MAYEUX, 2004; LUCHSINGER et al., 2004; MATTSON, 2004).

Do ponto de vista genético, a DA apresenta um caráter heterogêneo, tendo sido descritas as formas familiar e esporádica. A forma familiar da doença (a qual é relacionada a mutações em genes) tem herança autossômica dominante e o início dos sintomas clínicos geralmente ocorre antes dos 65 anos de idade, sendo considerada a forma mais rara (POIRIER, 2005). A proporção de casos de DA familiar varia muito, estima-se que seja entre 10% a 40%, e não se pode excluir o fato de que na totalidade, os casos de DA, incluindo os esporádicos, podem apresentar um fator genético determinante (SELKOE, 2011). Mutações e/ou polimorfismos em um de quatro grupos de genes predispõem a doença de Alzheimer: 1) mutações em genes codificadores para proteína precursora do peptídeo  $\beta$ -amilóide (APP), os quais compreendem menos que 0,01% dos casos); 2) herança de um ou dois alelos  $\epsilon 4$ , da apolipoproteína E (ApoE), que constitui o fator mais prevalente de predisposição a doença, compreendendo 30% do total de casos; e mutações no genes associados as proteínas pertencentes aos complexos enzimáticos que clivam APP, e geram os fragmentos tóxicos de amilóide, 3) como presenilina 1 (PSEN1), e a 4) presenilina 2 (PSEN2) (SAUNDERS et al., 1993; STRITTMATTER et al., 1993; LEVY-LAHAD et al., 1995; SHERRINGTON et al., 1995; BLENNOW et al., 1996).

Do ponto de vista neuropatológico, as principais alterações verificadas no cérebro dos pacientes portadores da doença de Alzheimer incluem atrofia cortical difusa com presença de um grande número de placas senis no espaço extracelular, e ainda os emaranhados neurofibrilares no espaço intracelular (GLENNER et al., 1984; MATTSON, 2004). As placas senis presentes no cérebro destes pacientes são depósitos extracelulares de fibrilas e agregados amorfos de peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ), composto essencialmente por 40 ou 42 aminoácidos (GLENNER e WONG, 1984) e os emaranhados neurofibrilares provenientes da fosforilação anormal da proteína Tau associada aos microtúbulos (GRUNDKE-IQBAL et al., 1986). Ambos estão associados à perda neuronal (SISODIA e PRICE, 1995; SELKOE, 1998). As placas senis e os emaranhados neurofibrilares estão presentes principalmente nas regiões do cérebro como o córtex e o hipocampo, que estão diretamente associadas ao aprendizado e memória. Com a progressão da doença ocorre a perda progressiva destas funções cognitivas (MATTSON, 2004; WALSH e SELKOE, 2004).

Há fortes indícios de que o peptídeo A $\beta$  tem um papel central na DA (WYSS-CORAY, 2006). Ele é gerado pela clivagem da APP, uma proteína transmembrana que em situações fisiológicas (ou via não-amiloidogênica) sofre duas clivagens enzimáticas, primeiramente pela enzima  $\alpha$ -secretase, seguido de clivagem pela  $\gamma$ -secretase, gerando um fragmento p3 atóxico. Na via amiloidogênica, não fisiológica, a APP é inicialmente clivada por uma protease aspártica, denominada  $\beta$ -secretase ou BACE (do inglês *beta-Site APP Cleaving Enzyme*), gerando proteínas precursoras  $\beta$ -amilóide solúveis (sAPP $\beta$ , do inglês *soluble amyloid precursor protein*  $\beta$ ) e resíduos de  $\beta$ -fragmento C-terminal (CTF $\beta$ , do inglês *C-terminal fragment*  $\beta$ ). CTF $\beta$  é então clivado pela  $\gamma$ -secretase que produz CTF $\gamma$  e fragmentos ou peptídeos A $\beta$  (HAASS, 2004; LAFERLA, GREEN e ODDO, 2007; SELKOE, 2011).

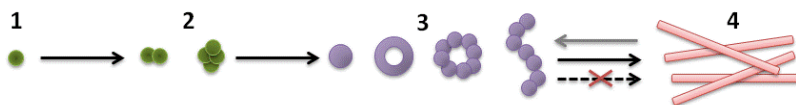
Ferramentas genéticas e farmacológicas distintas são utilizadas atualmente, por diferentes grupos de pesquisa, para estudar a doença de Alzheimer em animais de laboratório (como roedores). Dentre elas estão o uso de animais com idade avançada (igual ou superior a 14 meses), que apresentam prejuízos sensoriais e cognitivos, semelhantes aos observados nos indivíduos portadores de Alzheimer durante a progressão da doença. Porém, animais envelhecidos não apresentam evidências de acúmulo de A $\beta$  ou emaranhados neurofibrilares (WALLACE, KRAUTER e CAMPBELL, 1980; VAN DAM e DE DEYN, 2006; PREDIGER et al., 2007). Outra ferramenta é a utilização de camundongos transgênicos, podendo apresentar uma ou mais características da doença, dependendo das associações genéticas obtidas. Há aqueles que superexpressam a APP, a presinilina ou ainda a proteína tau. Além disso, há os transgênicos que apresentam a associação de dois ou dos três genes mutados citados acima (WALLACE, KRAUTER e CAMPBELL, 1980; WESTERMAN et al., 2002; VAN DAM e DE DEYN, 2006). Há ainda os modelos induzidos, dentre eles o que utiliza o peptídeo A $\beta$ , que pode ser administrado de maneira aguda ou em infusões repetidas (NAKAMURA et al., 2001). É importante ressaltar que uma única injeção do peptídeo A $\beta$  no cérebro dos animais não induz a formação de placas amilóides, apenas mimetiza alguns aspectos da fase inicial da doença de Alzheimer e é um modelo experimental útil para a caracterização da neurotoxicidade e da neuroinflamação induzida pelo peptídeo A $\beta$  (PASSOS et al., 2009; TAKEDA et al., 2009).

## 1.2 Peptídeos A $\beta$

O peptídeo A $\beta$  em solução é desestruturado, mas adquire uma conformação proteica do tipo  $\beta$ -folha que se agrega e dá início a uma formação amilóide (figura 1). A formação amilóide constituída por A $\beta$  segue um caminho de polimerização de nucleação que se caracteriza por uma fase inicial, a qual é denominada (1) espécie monomérica, em seguida formam-se (2) os oligômeros de baixo peso molecular (dímeros, trímeros e <8-meros) (JARRETT e LANSBURY, 1993; KELLY, 1998; KOO, LANSBURY e KELLY, 1999; JAN, HARTLEY e LASHUEL, 2010). Os monômeros apresentam peso molecular de aproximadamente 4 kDa, os dímeros de ~8 kDa e por consequência os trímeros ~12 kDa, estas observações foram realizadas utilizando-se técnicas de centrifugação e cromatografia de exclusão por tamanho dos extratos cerebrais de portadores da DA (SHANKAR et al., 2008). A associação e agregação de formas oligoméricas de baixo peso molecular formam um núcleo oligomérico rico em estruturas de conformação  $\beta$ -folha, que possui a tendência de agregar-se cada vez mais, e cresce formando agregados de maior peso molecular, de tamanhos e distribuição morfológica heterogêneos, os quais são referidos como (3) agregados pré-fibrilares (HARPER et al., 1997; JAN, HARTLEY e LASHUEL, 2010). Alguns destes agregados pré-fibrilares incluem 1) as protofibrilas, que são estruturas curvilíneas menores que 200 nm de comprimento e 4-6 nm de diâmetro (HARPER et al., 1997; BITAN et al., 2003). Também estruturas denominadas de 2) *A $\beta$ -derived diffusible ligands* (ADDLs), as quais possuem forma esférica de 3-5 nm de diâmetro. Há ainda 3) as conformações A $\beta$ -anulares, que se parecem mais com roscas (*donuts*), de diâmetro externo de 8-12 nm e diâmetro interno de 2–2,5 nm, e, ainda, 4) os outros oligômeros de baixo peso molecular (HARPER et al., 1997; KELLY, 1998; KOO, LANSBURY e KELLY, 1999).

Algumas das características que diferenciam os agregados protofibrilares (3), é que estes apresentam uma mistura de diferentes estruturas secundárias com predominância de estruturas  $\beta$ -folha; são suscetíveis a corantes específicos de amilóide como o Vermelho Congo (do inglês, *Congo red*) e a Tioflavina-T, porém de maneira menos intensa que as fibrilas maduras, e são menos estáveis que estas, existindo em equilíbrio com as formas monoméricas. Na presença de formas monoméricas de A $\beta$ ,

todas estas espécies se convertem a fibrilas amilóides maduras, devido à adição de monômeros. (4) Fibrilas amilóides maduras são insolúveis, são formações ricas em estruturas  $\beta$ -folha, que possuem mais de 1  $\mu\text{m}$  de comprimento e 8–12  $\text{nm}$  de diâmetro e são compostas de 2 a 6 subunidades protofilamentosas. (KOO, LANSBURY e KELLY, 1999; JAN, HARTLEY e LASHUEL, 2010). As formas sintéticas e recombinantes de A $\beta$  demonstraram formar agregados e fibrilas amilóides *in vitro* que são iguais aos dos isolados do cérebro de portadores de Alzheimer (NARANG, 1980; MERZ et al., 1983). As protofibrilas sintéticas parecem ser intermediárias de fibrilas, porém podem seguir por dois caminhos distintos: agregar-se mais para formar fibrilas ou dissociar-se formando espécies de menor peso molecular (WALSH et al., 1999).



**Figura 1. Estados de agregação do peptídeo A $\beta$ .** (1) monômeros, (2) oligômeros de baixo peso molecular, (3) oligômeros de alto peso molecular: protofibrilas e ADDLs, por exemplo. (4) fibrilas. As setas indicam a direção de formação de fibrilas. O desenho não foi feito de acordo com a escala. (Baseado em (JAN, HARTLEY e LASHUEL, 2010); Nature Protocols).

Os termos A $\beta$  solúvel e insolúvel, se referem às formas monoméricas e oligoméricas [figura 1; (1), (2) e (3)], e as fibrilas maduras [figura 1; (4)] que formam as placas senis observadas durante a progressão da doença, respectivamente, são empregados porque alguns estudos utilizaram o termo solúvel para todas as formas de A $\beta$  que permaneceram em solução aquosa após centrifugação em alta velocidade dos extratos cerebrais de portadores da DA (KUO et al., 1996; SHANKAR et al., 2008). Diversos estudos sugeriram que os intermediários iniciais no processo de formação de fibrilas, por exemplo, oligômeros e protofibrilas, são as principais espécies de A $\beta$  responsáveis pela toxicidade e tem um papel central na doença de Alzheimer, visto que, as placas amilóides fibrilares estão fracamente correlacionadas com a perda cognitiva, enquanto que as formas solúveis de A $\beta$  (monômeros, oligômeros e protofibrilas) estão

fortemente relacionadas com a severidade da doença e os sintomas cognitivos (IRIZARRY et al., 1997; MCLEAN et al., 1999; WANG et al., 1999). Corroborando estes dados, Shankar e colaboradores (2008) demonstraram que microinjeções de extrato cerebral dos portadores da DA, rico em dímeros solúveis, em cérebros de ratos adultos promovia prejuízo na memória e aprendizado. Além disso, oligômeros de A $\beta$  foram capazes de induzir alterações da proteína tau, como a fosforilação em cultura primária de neurônios hipocâmpais (ZEMPEL et al., 2010). Estes achados nos indicam que os oligômeros solúveis de A $\beta$  são capazes de induzir algumas das características da doença de Alzheimer, como dano sináptico, fosforilação da proteína tau e perda da memória, sem a formação das placas amilóides.

Os oligômeros de A $\beta$  foram caracterizados por Lambert e colaboradores (1998) em um estudo sobre a ação da clusterina sobre a agregação do peptídeo A $\beta$ . Este estudo demonstrou que clusterina – uma proteína encontrada na circulação sanguínea, também conhecida como Apolipoproteína J, e que tem como função, dentre outras funções ainda não muito bem caracterizadas, o transporte de lipídeos – promove o acúmulo de oligômeros solúveis e impede a formação de placas amilóides. De maior importância, neste mesmo trabalho foi demonstrado que estes oligômeros são potentes neurotoxinas. Eles inibiram rapidamente a potenciação de longo prazo (LTP, do inglês *Long Term Potentiation*), medida em fatias do cérebro de ratos, promovendo um prejuízo sináptico (LAMBERT et al., 1998). Além disso, um estudo recente mostrou que a concentração de clusterina plasmática é o mais novo fator de risco associado à doença de Alzheimer (THAMBISETTY et al., 2010). Após mais de uma década de investigação sobre os oligômeros e a sua toxicidade, existem mais de 1000 artigos que abordam este assunto (FERREIRA e KLEIN, 2011). Todos estes achados da literatura deram suporte para a suposição de uma nova teoria sobre o papel do peptídeo A $\beta$  na doença de Alzheimer a “Hipótese dos Oligômeros”. A proposição até o momento é que na fase inicial da doença os oligômeros são responsáveis por induzir falhas na plasticidade sináptica, e com a progressão da doença chegando a fase tardia, degeneração e morte celular (FERREIRA e KLEIN, 2011).

A “Hipótese dos Oligômeros” é relativamente nova, e não subjugua completamente a teoria antiga, a “Hipótese da Cascata Amilóide” que por



muitos anos foi o centro de muitos estudos relacionados à doença (FERREIRA e KLEIN, 2011). Esta teoria surgiu no final da década de 1980 e foi pré-suposta por dois grupos diferentes (ALLSOP et al., 1988; SELKOE, 1989). No ano de 1992, Hardy and Higgins, através de um trabalho de revisão, formalizaram a hipótese. Nesta hipótese a demência estaria relacionada à morte neuronal causada pelas placas amilóides fibrilares e insolúveis (HARDY e HIGGINS, 1992). Sabe-se atualmente que a doença de Alzheimer está relacionada à agregação do peptídeo A $\beta$ , e que as fibrilas (formadoras das placas amilóides) insolúveis não são as únicas toxinas formadas pelo processo de agregação, e provavelmente não são as toxinas mais relevantes para a toxicidade observada na doença e caracterizada em modelos experimentais. As formas solúveis de A $\beta$  (monômeros, oligômeros de baixo peso molecular, ADDLs e protofibrilas) parecem estar mais associadas à progressão da doença, como por exemplo, o prejuízo da plasticidade sináptica e neurodegeneração (FERREIRA e KLEIN, 2011).

### 1.3 Neuroinflamação

A neurodegeneração observada durante a progressão da doença de Alzheimer está envolvida com diversos mecanismos, dentre eles alguns complexos e pouco conhecidos, mas em especial com o efeito do peptídeo A $\beta$  em dois mecanismos muito bem descritos, 1) o estresse oxidativo: disfunção mitocondrial, ativação de receptores NMDA, excitotoxicidade induzida por Ca<sup>2+</sup> e produção de espécies reativas de oxigênio por exemplo (SATTler e TYMIANSKI, 2000; DE FELICE et al., 2007; BICCA et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2011); e 2) processo inflamatório: ativação de enzimas, expressão de proteínas inflamatórias, citocinas, ativação glial entre outros (MCGEER e MCGEER, 2002; WYSS-CORAY, 2006; MEDEIROS et al., 2007; MEDEIROS et al., 2010; PASSOS et al., 2010). Sabe-se que o processo inflamatório crônico contribui de maneira decisiva para os fenômenos celulares observados na doença de Alzheimer (AKIYAMA et al., 2000; MINGHETTI, 2005; MINGHETTI et al., 2005). Experimentalmente a neuroinflamação tem sido caracterizada em diferentes modelos, incluindo o modelo induzido pelo peptídeo A $\beta$  (MEDEIROS et

al., 2007; MEDEIROS et al., 2010; PASSOS et al., 2010; BROTHERS, MARCHALANT e WENK, 2011; RUSSO et al., 2011; ZHOU et al., 2011). Através da caracterização do modelo de neuroinfamação induzida pelo peptídeo A $\beta$ , observou-se, ativação de células gliais (astrócitos e microglia), produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), produção de enzimas inflamatórias e oxidativas como a ciclooxygenase-2 (COX-2) e a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS, do inglês *inducible Oxide Nitric Sintase*), entre outros marcadores (MEDEIROS et al., 2007; MEDEIROS et al., 2010; PASSOS et al., 2010). Medeiros e colaboradores (2007), utilizando injeção única do peptídeo A $\beta_{1-40}$  por via i.c.v., avaliaram a participação das diferentes proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*) nos mecanismos intracelulares envolvidos na toxicidade induzida pelo peptídeo A $\beta$ ; as seguintes MAPKs foram caracterizadas neste estudo: a p-38/MAPK, a proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK, do inglês *Extracellular-signal-Regulated Kinases*) e a proteína quinase c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal (JNK, do inglês *c-Jun N-terminal Kinases*). Ressalta-se que este modelo não é útil apenas para o estudo das alterações inflamatórias, mas também para estudo das alterações oxidativas, que são características das fases iniciais da doença de Alzheimer (BICCA et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2011). Estas evidências sugerem que o modelo utilizado nesse trabalho é útil para avaliar as alterações associadas ao processo oxidativo e inflamatório induzido pelo peptídeo A $\beta$  no cérebro.

As reações inflamatórias no SNC podem ser causadas por diferentes formas de lesões, como por exemplo, traumatismo craniano e isquemia cerebral (MORGANTI-KOSSMANN et al., 2001; WANG e LO, 2003). Uma importante consequência da inflamação cerebral é o edema, com aumento da permeabilidade vascular, fluxo sanguíneo e retenção de fluidos no tecido inflamado, bem como a produção e liberação de mediadores inflamatórios como, por exemplo, radicais livres e citocinas, que podem contribuir para o efeito citotóxico direto no tecido cerebral (DENES, FERENCZI e KOVACS, 2011). Em humanos, agonistas para os receptores de cininas aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica, pela estimulação da produção de óxido nítrico (NO) e ativação de ciclooxygenase em células endoteliais cerebrais (PRAT et al., 2000). A ativação dos receptores de cininas no cérebro estimula a produção

de ácido araquidônico e seus metabólitos, contribuindo para a formação de edema e vasodilatação cerebral (WALKER, PERKINS e DRAY, 1995). De fato, estudos atuais sugerem o envolvimento do sistema cinina-caliceínas em modelos experimentais da DA (VIEL et al., 2008; AMARAL et al., 2010).

#### 1.4 Cininas

As cininas representam um grupo de peptídeos envolvidos em diversos processos fisiopatológicos, sendo produzidas no plasma e tecidos em resposta a estímulos fisiológicos ou durante o processo inflamatório (MARCEAU, HESS e BACHVAROV, 1998). As cininas são peptídeos biologicamente ativos formados a partir de  $\alpha$ -globulinas, conhecidas como cininogênios, através da ação proteolítica de caliceínas (PROUD e KAPLAN, 1988). A maior parte das ações das cininas é mediada pela estimulação de dois tipos de receptores, que possuem sete domínios transmembrana que estão acoplados à proteína-G (LIAO e HOMCY, 1993), denominados  $B_1$  ( $B_1R$ ) e  $B_2$  ( $B_2R$ ) (REGOLI e BARABE, 1980). Os receptores  $B_2$  estão distribuídos de forma constitutiva no organismo, em tecidos periféricos e centrais, e apresentam elevada afinidade pela bradicinina (BK) e pelo peptídeo Lys-BK (SIEBECK et al., 1998). A ativação deste receptor pode estar relacionada à estimulação direta ou indireta de diferentes mecanismos de transdução. Em contrapartida, os receptores  $B_1$  apresentam alta afinidade pelos metabólitos da bradicinina des-Arg<sup>9</sup>-BK e Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK, provenientes da quebra da bradicinina pela ação da enzima cininase I (carboxipeptidase N). Além disso, os receptores  $B_1$  não são, geralmente, expressos sob condições fisiológicas, sendo induzidos durante lesão tecidual e estímulos inflamatórios como, por exemplo, tratamento com endotoxina bacteriana e citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) (MARCEAU, HESS e BACHVAROV, 1998; CALIXTO et al., 2000; , 2001; COUTURE et al., 2001). Porém, em alguns tecidos, especialmente no SNC, os receptores  $B_1$  são expressos de maneira constitutiva; sob lesão tecidual e/ou resposta inflamatória sua expressão torna-se aumentada (CALIXTO et al., 2004). Apesar das diferenças entre os receptores  $B_1$  e  $B_2$  para as cininas, na maioria das vezes, as vias de transdução acionadas pelos

dois tipos de receptores são muito semelhantes (LIEBMANN e BOHMER, 2000; LIEBMANN, 2001). Estes receptores são preferencialmente acoplados a proteínas Gai e Gaq (LIAO e HOMCY, 1993) e suas ativações podem estar relacionadas à estimulação direta ou indireta de diversas vias de sinalização intracelular (SCHANSTRA et al., 1999; LIEBMANN e BOHMER, 2000; LIEBMANN, 2001).

### *1.5 Cininas e Doença de Alzheimer*

Estudos sugeriram o envolvimento do sistema calicreína-cininas na fisiopatologia da doença de Alzheimer (HUANG et al., 1995; JOSEPH et al., 1999; VIEL e BUCK, 2011), e o número de trabalhos sugerindo este envolvimento vem aumentando a cada ano. Estudos demonstraram aumento na expressão dos receptores B<sub>2</sub> para cininas em regiões cerebrais afetadas pela doença de Alzheimer, como o bulbo olfatório, córtex pré-frontal e hipocampo (JONG et al., 2002; JONG et al., 2003). De outra maneira, Viel e colaboradores (2008), mostraram aumento na expressão de receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, em diferentes regiões cerebrais, após a infusão contínua de A $\beta$ <sub>1-40</sub> em ratos. De modo relevante um aumento na secreção de APP foi observado quando fibroblastos humanos foram tratados com bradicinina (RACCHI et al., 1998). Além disso, Jong e colaboradores (2003) demonstraram aumento na transdução do sinal iniciado pela bradicinina em fibroblastos isolados de amostras de cérebros de pacientes portadores da doença de Alzheimer, ainda foi sugerida a associação deste sinal iniciado pela bradicina com uma hiperfosforilação da proteína tau. Mais recentemente, Prediger e colaboradores (2008) demonstraram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) da proteína A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos promove danos cognitivos, sendo estes bloqueados pelo antagonismo ou deleção dos receptores B<sub>2</sub>. Em conjunto estes estudos sugerem um possível envolvimento do sistema cininérgico na progressão e desenvolvimento da doença de Alzheimer.

## *1.6 Justificativa*

Diante do exposto, estudos adicionais são de grande relevância para um melhor entendimento dos possíveis mecanismos de modulação das cininas e seus receptores nos processos fisiopatológicos da neuroinflamação característica da doença de Alzheimer, aqui estudada pelo uso do peptídeo A $\beta$ . Sendo assim, neste trabalho propusemos hipóteses que nos permitissem sugerir os receptores B<sub>2</sub> e algumas de suas vias de sinalização, como alvos para o tratamento farmacológico da neuroinflamação característica da DA.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo geral*

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel do receptor  $B_2$  para as cininas na neuroinflamação e na toxicidade do hipocampo induzida após administração intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo  $\beta$ -amilóide fragmento 40 ( $A\beta_{1-40}$ ) em camundongos e os possíveis mecanismos de sinalização intracelulares envolvidos.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- Induzir e confirmar o estado de agregação/oligomerização do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ .
- Caracterizar o papel do receptor  $B_2$  para as cininas no dano cognitivo induzido pela administração i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos.
- Avaliar a expressão do receptor  $B_2$  no hipocampo de camundongos após administração do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  e analisar o efeito do tratamento com o antagonista seletivo para o receptor  $B_2$  o HOE 140 sobre a expressão deste receptor no hipocampo.
- Elucidar a participação do receptor  $B_2$  na disfunção sináptica induzida pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos.

- Avaliar o envolvimento do receptor B<sub>2</sub> no processo inflamatório induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> no hipocampo de camundongos, através da análise da expressão das enzimas COX-2, iNOS e nNOS, bem como da ativação microglial.
- Determinar as vias de sinalização envolvidas na participação do receptor B<sub>2</sub>, nas alterações comportamentais e moleculares induzidas pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>, através da análise da ativação/expressão das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKS) e proteínas alvos específicas, bem como de diferentes isoformas de proteínas quinase C (PKC).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Para realizar os procedimentos comportamentais e as análises moleculares foram utilizados camundongos machos adultos (3-4 meses) da linhagem *Swiss* pesando entre 30 e 40g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em câmaras ventiladas (ALESCOS®) com temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade (60 - 80%) e luminosidade (ciclo de claro/escuro de 12 horas) controladas. Água e ração foram providas *ad libitum*, exceto durante os procedimentos experimentais. Os animais permaneceram nas salas de experimentação durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização dos testes comportamentais, que foram realizados geralmente entre 8 e 16 h.

Os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institutes of Health dos Estados Unidos da América (Publicação do NIH No. 85-23, revisado em 1996). Todos os procedimentos empregados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo número: PP00625/Ofício número 85 CEUA/PRPe/2011).

#### 3.2 Agregação do peptídeo $\beta$ -amilóide

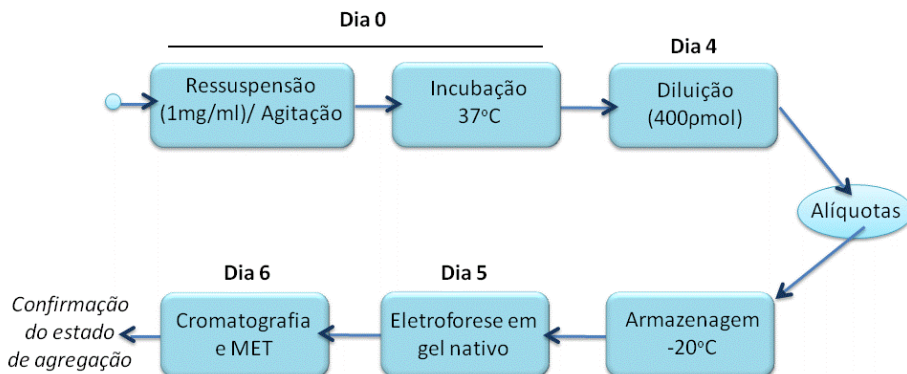
O estado de agregação é um fator crítico na toxicidade induzida por  $\beta$ -amilóide (PIKE et al., 1991). Portanto, previamente a administração *in vivo*, este peptídeo foi submetido ao protocolo de agregação (ou oligomerização), como descrito anteriormente (EL KHOURY et al., 1996), com algumas adaptações (Figura 2). O peptídeo humano  $\beta$ -amilóide



fragmento 40 ( $A\beta_{1-40}$ ) (Abbiotec LLC, San Diego, CA, USA) e o peptídeo inverso  $A\beta_{40-1}$  (Bachem, Torrance, CA, USA), utilizado como controle negativo, foram dissolvidos (1mg/ml) em tampão fosfato estéril (PBS; pH 7,4) e incubados a 37° C em banho-maria por 4 dias. As alíquotas do peptídeo (100  $\mu$ l) foram armazenadas a - 20° C até o momento da administração. Adicionalmente, uma preparação com o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  dissolvido (1mg/ml) em tampão fosfato estéril (PBS; pH 7,4), não foi submetido ao processo de incubação e foi utilizado como controle do estado de agregação.

### 3.3 *Verificação do estado de oligomerização/agregação do peptídeo $\beta$ -amilóide*

A fim de verificar a agregação e/ou oligomerização do peptídeo  $\beta$ -amilóide foram realizados diferentes métodos de avaliação do estado de agregação da preparação, sendo estes: 1) eletroforese em gel nativo de poliacrilamida (MEUCCI, MORDENTE e MARTORANA, 1991), 2) cromatografia de exclusão por tamanho em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e 3) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (JAN, HARTLEY e LASHUEL, 2010), (Figura 2).



**Figura 2 – Esquema usado para a preparação do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , incluindo agregação e análises do estado de agregação.**

### 3.3.1 Eletroforese em gel nativo de poliacrilamida

A Eletroforese foi realizada segundo Laemmli (1970), conforme reproduzido por Meucci e colaboradores (1991), com pequenas modificações. Foi utilizado gel de poliacrilamida 40%. As diferentes alíquotas de  $A\beta_{1-40}$  (1mg/ml), submetidas ou não ao processo de agregação, foram depositadas no gel em poços previamente preparados e então realizado o processo de eletroforese com as seguintes características: 150 volts e 40 mA durante 3 horas. Após o término da eletroforese o gel foi submetido à fixação e em seguida submetidos à coloração com solução de nitrato de prata 0,1% ( $AgNO_3$ ) para revelação das bandas correspondentes aos peptídeos agregados e não-agregados.

### 3.3.2 *Cromatografia de exclusão por tamanho*

A presença de oligômeros e monômeros nas preparações do peptídeo A $\beta$  foi avaliada por cromatografia de exclusão por tamanho em CLAE. O protocolo utilizado foi descrito anteriormente por JAN e colaboradores (2010). Inicialmente, foram injetados 30  $\mu$ l de cada amostra de peptídeo A $\beta$  (1mg/ml), agregado ou não, em uma coluna Biosuite 250 (5 $\mu$ m HR SEC, tamanho 7,8 x 300 mm) acoplada a um módulo de separação Waters 2.796 de alta sensibilidade de detecção. O tempo de corrida foi de 30 minutos para cada amostra e as amostras foram analisadas no mínimo duas vezes no mesmo protocolo experimental. O tampão de corrida utilizado foi o TRIS-HCL 10mM (pH 7,4) e as amostras eluíram a uma taxa de fluxo de 0,1 ml/min, a qual está dentro da capacidade de vazão do sistema cromatográfico. A detecção foi realizada por detector ultravioleta em comprimento de onda de 210 nm, que para fins analíticos é o mais recomendado.

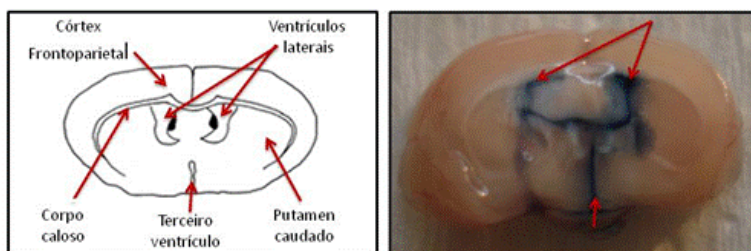
### 3.3.3 *Microscopia Eletrônica de Transmissão*

A caracterização morfológica através da Microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada objetivando uma melhor caracterização das preparações do peptídeo A $\beta_{1-40}$ . A análise MET foi realizada como descrito anteriormente (JAN, HARTLEY e LASHUEL, 2010). Foram utilizadas duas amostras, uma contendo A $\beta_{1-40}$  agregada e outra contendo A $\beta_{1-40}$  não-agregada. Brevemente, 2 $\mu$ L de cada amostra (1mg/ml) foram depositados em uma grade formvar revestida, apropriada para MET, e permaneceram em repouso para que ocorresse adsorção durante 60 segundos. Qualquer excesso de solução foi removido por limpeza da borda da rede com um pedaço de papel toalha. Então, 10  $\mu$ L de acetato de uranila (AU) 2% foram depositados na grade e a mesma deixada em repouso por mais 60 segundos. O eventual excesso de solução AU foi removido, da mesma maneira descrita acima, e as grades deixadas para secar em temperatura ambiente até o momento da análise. As imagens das grades foram adquiridas em um

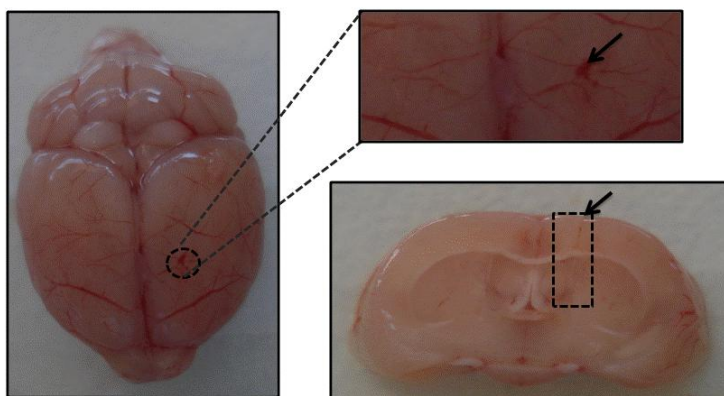
Microscópio Eletrônico JEM-1011, equipado com uma câmera (JEOL Ltd., Tóquio, Japão), no centro de microscopia eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, a uma voltagem de aceleração de 8-10 KV.

### 3.4 *Administração intracerebroventricular do peptídeo $\beta$ -amilóide*

Os peptídeos humanos  $A\beta_{1-40}$  e  $A\beta_{40-1}$  foram preparados e agregados como descrito anteriormente. Após a confirmação do estado de agregação as formas agregadas dos fragmentos  $A\beta$  (400 pmol/ sítio) ou PBS (veículo) foram administrados por via intracerebroventricular (i.c.v.), como descrito previamente (MEDEIROS et al., 2007; PREDIGER et al., 2007; PREDIGER et al., 2008). Resumidamente, os animais foram anestesiados com isoflurano 2,5% (Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), utilizando um sistema vaporizador (SurgiVet Inc., Waukesha, WI, EUA), e gentilmente contidos com as mãos para a realização da injeção i.c.v. O local da injeção foi esterilizado com gaze embebida em álcool 70%. Sob anestesia leve (ou seja, apenas o suficiente para perder o reflexo postural), uma agulha foi inserida unilateralmente 1 mm à direita do ponto equidistante da linha média de cada olho e 1 mm posterior a uma linha traçada através da base anterior dos olhos (LAURSEN e BELKNAP, 1986). Um volume de 3  $\mu$ L das soluções contendo peptídeos  $A\beta$  ou solução PBS foi injetado no ventrículo lateral nas seguintes coordenadas a partir do bregma: ântero-posterior (AP) = -0,22 mm, médio-lateral (ML) = 1 mm, e dorsoventral = -3 mm. Como apresentado na figura 3, alguns animais receberam solução do corante azul de Evans a fim de demonstrar o local correto da injeção e o perfil de difusão das soluções após a infusão no ventrículo. A inserção precisa da agulha no local de injeção (traço da agulha) nos animais tratados foi confirmada no momento da dissecação do tecido cerebral antes de realizar o procedimento para imunoistoquímica, conforme ilustrado na figura 4. Os resultados dos camundongos que apresentaram sinais de inserção incorreta da agulha ou qualquer sinal de hemorragia cerebral foram excluídos da análise estatística (menos de 5% do total de animais foram excluídos).



**Figura 3 – Esquema ilustrando os ventrículos e outras regiões cerebrais (esquerda) e a difusão do corante azul de Evans pelos ventrículos (direita).**



**Figura 4 – Imagens representativas do local de inserção da agulha e o traço da agulha até o ventrículo.**

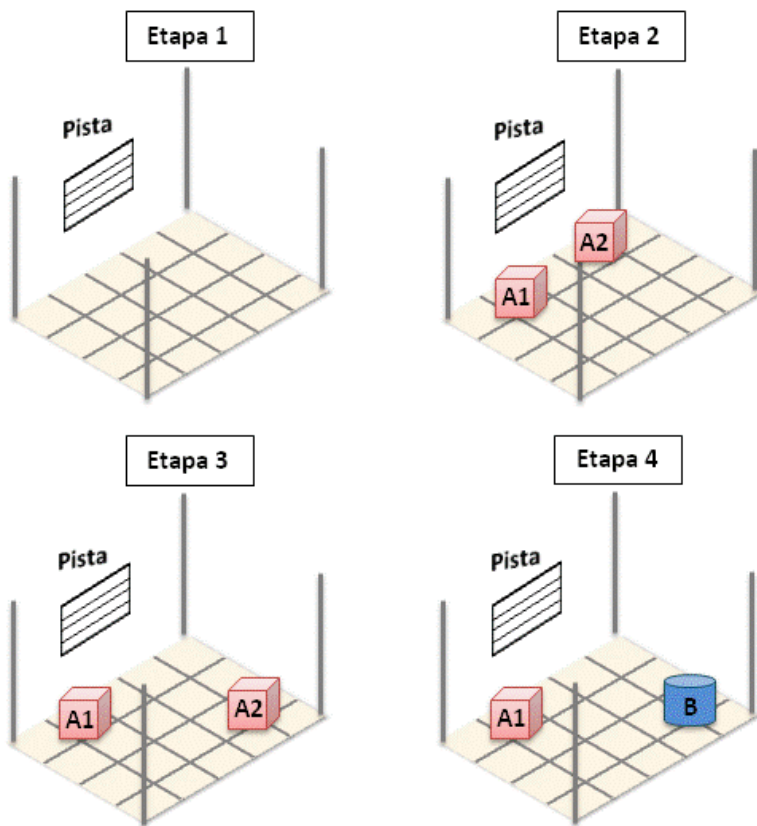
### 3.5 Tratamento farmacológico

De acordo com cada protocolo experimental, diferentes grupos de animais foram utilizados para a realização dos testes comportamentais. Com a finalidade de avaliar o possível papel do receptor  $B_2$  para as cininas sobre a neuroinflamação induzida pelo peptídeo  $A\beta$ , os animais da linhagem *Swiss* foram tratados com o antagonista peptídico seletivo e não-competitivo para o receptor  $B_2$ , o HOE 140 (Aventis, Frankfurt Main, Alemanha) em dois diferentes tempos, 2 h antes ou ainda 24 h após a injeção do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  ou PBS. Ainda foram utilizados os antagonistas seletivos do receptor  $B_2$ , pseudopeptídico, o NPC 18688 (Scios Nova, Baltimore, USA), e o não peptídico, o FR 173657 (Astellas Pharma Europe, Middlesex, Reino Unido) que foram administrados 2h antes do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  ou PBS. Inicialmente foram preparadas soluções estoques dos antagonistas de  $10^{-3}$  M, para o HOE 140 e para o NPC 18688 e de  $10^{-2}$  M, para o FR 173657, as quais foram armazenadas em tubos plásticos siliconizados (Eppendorf®) mantidos a  $-20$  °C até o momento do uso. As soluções estoques foram diluídas imediatamente antes do uso em tampão PBS estéril (pH 7,4) e administradas via i.c.v. nas doses de 50  $\mu$ mol para o HOE 140, 500  $\mu$ mol para o NPC 18688 e 5 nmol para o FR 173657, por sítio em um volume de 5  $\mu$ l nos tempos determinados para cada protocolo experimental antes ou depois do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  ou PBS. As concentrações dos antagonistas foram escolhidas baseando-se em estudos da literatura e nas potências dos antagonistas (GOBEIL et al., 1999; PREDIGER et al., 2008). Camundongos controle foram tratados por via i.c.v. com solução PBS estéril (pH 7,4).

### 3.6 *Testes comportamentais*

#### 3.6.1 *Reconhecimento de Objetos*

O teste do reconhecimento de objetos foi realizado como descrito anteriormente (SANTOS et al., 2012). Brevemente, é composto por quatro etapas (figura 5) e é realizado no campo aberto adaptado, sendo este diferente do usual por conter uma pista visual que é situada entre dois objetos, fixada em uma das paredes do aparato, com o intuito de ser utilizada como parâmetro de memória. No primeiro momento (etapa 1) os animais foram expostos ao campo aberto adaptado durante 3 minutos com o objetivo de reconhecer a área experimental. Na segunda etapa, denominada treino, o animal foi novamente colocado no campo aberto adaptado, porém na presença de dois objetos idênticos, designados A1 e A2, localizados lado-a-lado na direção da pista visual que está contida na borda. Durante a primeira sessão de teste (terceira etapa), o objeto A2 que na sessão anterior estava localizado ao lado do objeto A1 foi deslocado e posicionado na diagonal do objeto A1. No segundo teste (quarta etapa), o objeto A2 foi substituído por outro objeto denominado B, e ambos os objetos permaneceram na mesma posição da primeira sessão de teste (etapa 3). Cada etapa possuiu tempo máximo de duração de 6 minutos, e o tempo de espera entre uma etapa e outra foi de 3 minutos. Neste teste foi quantificado o tempo que o animal explorou cada um dos objetos, e os dados foram expressos como a porcentagem da razão entre a exploração do objeto deslocado (A2) ou objeto novo (B) em relação ao tempo total de exploração do objeto conhecido (A1). Neste teste avalia-se a memória espacial através da capacidade dos animais reconhecerem os objetos apresentados, considerou-se como bom desempenho (capacidade de memorização) quando os animais exploraram o objeto deslocado ou o objeto novo em um tempo significativamente maior que o gasto para explorar o objeto já conhecido.



**Figura 5 – Esquema representativo das etapas do teste de reconhecimento de objetos.**



### 3.7 *Coleta de tecidos para a realização dos experimentos de western blot e imunoistoquímica*

Com o objetivo de avaliar o envolvimento do receptor  $B_2$  para as cininas nas alterações inflamatórias e moleculares após a administração i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , os hipocampus dos animais tratados com HOE 140 ou veículo foram coletados em diferentes tempos (6h, 24h, 8 dias e 15 dias) após a injeção de  $A\beta$  e submetidos aos ensaios de western blot e/ou imunoistoquímica. Para tal, alguns grupos experimentais foram sacrificados por decapitação e seus cérebros removidos e lavados com solução salina (NaCl 0,9%) gelada (4 °C). Imediatamente após, os cérebros foram dissecados sobre uma placa de Petri mantida em gelo seco. Os hipocampus foram dissecados e em seguida foram armazenados em freezer a -70 °C até o momento do uso.

Em uma nova série de experimentos, outro grupo de animais foi perfundido com solução salina e paraformaldeído 4%, em seguida os cérebros foram removidos e mantidos em solução de paraformaldeído 4% durante 24h. Posteriormente, foram realizadas secções coronais na região central do hipocampo, procedido de processamento histológico, inclusão em parafina e microtomia. Os cortes teciduais de espessura de 3-4  $\mu$ m foram montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em acetona PA a 5% e mantidas em estufa a uma temperatura de 50 °C durante 1 hora, para a fixação dos cortes.

### 3.8 *Imunodeteção de proteínas por western blot*

#### 3.8.1 *Preparação do extrato celular total*

As amostras de hipocampo foram coletadas no décimo quinto (15º) dia após a administração i.c.v. do peptídeo  $A\beta$  e depois foram

homogeneizadas manualmente (com auxílio de micro pistilos) em tampão RIPA gelado composto por Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), deoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, tampão PBS (pH 7,4) na presença dos seguintes inibidores enzimáticos: leupeptina 20 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, pepstatina A 20 µg/ml e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos e em seguida centrifugadas (10.000 g, 4 °C, durante 10 minutos). O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi coletado, sendo este o extrato celular total contendo as proteínas dissolvidas no meio. Os extratos celulares totais foram armazenados em freezer a -70 °C até o momento do uso.

### **3.8.2    *Determinação da concentração de proteínas***

A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo Método de Lowry como descrito anteriormente (LOWRY et al., 1951). De maneira breve, 4,9 ml de reativo A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% em NaOH 0,1N) foram misturados a 0,1 ml de reativo B, que consiste na união de duas partes iguais de solução de tartarato de sódio e potássio ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 2% e solução alcalina de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 1%, formando desta maneira o reativo C (reativo A + reativo B). Um volume de 200 µl de reativo C foi adicionado a 20 µl de cada amostra e estas foram incubadas durante 10 minutos. Em seguida, foi acrescentado o reagente de titulação FOLIN-Ciocalteu Fenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído duas vezes em água destilada a fim de conseguir uma solução final de 1N. As amostras foram novamente incubadas, agora, durante 20 minutos e em ambiente escuro. Em seguida as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 650 nm. A curva padrão (0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 mg/ml) foi preparada a partir de diluições de uma solução estoque de albumina bovina fração V (10 mg/ml) (pH 7,0) (AppliChem, St. Louis, MO, USA).

### 3.8.3 Ensaio de imunodeteção

Os experimentos de Western blot foram realizados como descrito previamente (DUTRA et al., 2011). Os extratos dos tecidos previamente preparados como descrito no item 3.8.1 e 3.8.2, foram diluídos de modo a apresentar a mesma concentração de proteína (4 mg/ml), foram misturadas em volumes iguais ao tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM (pH 6,8),  $\beta$ -mercaptoetanol 15%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%, azul de bromofenol 0,3%, glicerol 25%) e fervidas por 5 minutos a 100 °C. Quantidades iguais de proteínas para cada amostra (15  $\mu$ g ou 30  $\mu$ g) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (8-12%). A próxima etapa consistiu na transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sob as seguintes condições: 100 V e 30 mA durante 1 hora. Após a transferência, as membranas foram saturadas em solução de TBS-T (Tris 1,2 g; NaCl 8,76 g e tween 0,05% em água destilada) contendo leite desnatado (5%) por no mínimo 1 hora, a temperatura ambiente. Após a lavagem em TBS-T (4 vezes), as membranas foram incubadas em tempo e condições apropriadas para cada anticorpo primário contra as seguintes proteínas de interesse para o estudo: anti- $\beta$ -actina (1:500), anti- proteína quinase C isoforma  $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) (1:1000), anti-proteína quinase C isoforma  $\delta$  (PKC $\delta$ ) (1:1000), anti-proteína quinase ativada por mitógeno p-38 (p-38/MAPK) (1:500), anti-fosfo-p38 (forma fosforilada) (1:2000), anti-c-Jun N-terminal quinase (JNK) (1:1000), anti-fosfo-JNK (forma fosforilada) (1:1000), anti-proteína quinase ativada por mitógeno ERK (ERK/MAPK) (1:1000) e anti-fosfo-ERK (forma fosforilada) (1:1000), todos da Santa Cruz Biotech. Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Foram utilizados também anticorpos anti-clicooxigenase-2 (COX-2), anti-domínio pós-sináptico 95 (PSD-95), anti-c-Jun, anti-fosfo-c-jun (forma fosforilada), anti-sinaptofisina e anti-óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), todos na diluição de 1:1000 e provenientes da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Ainda, foram empregados anticorpo anti-óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (1:2000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-receptor B<sub>2</sub> para bradicina (B<sub>2</sub>R) (1:1000) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) e anti-*ionized calcium binding adaptor molecule 1* (Iba-1) (1:1000) (Abcam, Cambridge, MA, USA). Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas em TBS-

T (4 vezes) e incubadas com anticorpo secundário específico (camundongo ou coelho) conjugado a peroxidase (1:25.000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Os imunocomplexos foram visualizados usando sistema de detecção de substrato quimioluminescente, SuperSignal West Femto (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, EUA) e filme radiográfico (Hyperfilm ECL) (GE Healthcare, São Paulo, SP, Brasil), segundo recomendações do fabricante. Os valores densitométricos foram normalizados utilizando como controle as bandas imunorreativas contra o anticorpo anti- $\beta$ -actina. Os filmes foram digitalizados e os níveis de proteína foram quantificados por densidade óptica utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA) e os valores expressos como unidades arbitrárias em relação a  $\beta$ -actina.

### 3.9 *Análise histológica e imunoistoquímica*

Os cortes histológicos obtidos, depois de previamente fixados como descrito na seção 3.7, foram desparafinados por imersões consecutivas em xilol e reidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80% e 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% e metanol absoluto (v/v) por 20 minutos e em ambiente escuro, com posterior lavagem em água destilada. Em seguida, as lâminas foram submetidas ao tratamento para a reativação antigênica, visando recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em paraformaldeído e parafina. Desta maneira, foi preparada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1M (pH 6,0). As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98 °C, durante 45 minutos. Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente e lavadas com água destilada. Após a lavagem as lâminas foram submersas em PBS.

A imunodeteção foi realizada com os seguintes anticorpos contra as proteínas de interesse: anti-fosfo-JNK (forma fosforilada) (1:750) e anti-fosfo-ERK (forma fosforilada) (1:250), ambos da Santa Cruz Biotech. Inc. (Santa Cruz, CA, USA), anti-sinaptofisina (1:400) e anti-COX-2 (1:250), ambos da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), anti-B<sub>2</sub>R (1:200) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel), anti-iNOS (1:500) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e anti-Iba-1 (1:200) (Abcam, Cambridge, MA, USA). A solução contendo os anticorpos previamente diluídos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 12 a 16 horas (*overnight*). A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente. Após a lavagem, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotilado apropriado (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) em câmara úmida durante 50 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS e a detecção foi realizada com o uso de solução peroxidase-estreptavidina (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca). Após 40 minutos de incubação em câmara úmida à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com PBS e a detecção foi completada com o uso de solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetra-amino-bifenil-tetra-hidrocloreto) e 0,3% de peróxido de hidrogênio (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca), seguida de contra-coloração em solução de hematoxilina de Harris, desidratação pela passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio permanente (Entellan; Merck, São Paulo, SP, Brasil). Para cada reação foi utilizado um controle negativo que consiste na remoção do anticorpo primário da reação.

As imagens dos cortes foram capturadas e digitalizadas por uma câmera digital (Sight DS-5M-L1) acoplada a um microscópio óptico (Nikon, Melville, NY, USA). A imunomarcagem foi avaliada em quatro níveis do hipocampo dorsal. Especificamente, quatro seções alternadas de 3 µm do hipocampo, com uma distância individual de aproximadamente 150 µm, foram obtidas entre 1,6 e 2,4 mm posteriormente ao bregma. Imagens das sub-regiões hipocâmpais coradas CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD) foram adquiridas em ampliação de 400 vezes. A quantificação relativa da imunodeteção foi obtida através da análise de densitometria (densidade óptica), utilizando o software de imagens NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA). Uma imagem foi capturada com precisão de cada

sub-região do hipocampo por seção (quatro imagens por seção). Todas as imagens foram adquiridas pelo mesmo microscópio sob as mesmas configurações. Brevemente, a quantificação das imagens aconteceu da seguinte maneira: uma gama de pixels castanhos foram visualmente selecionados e utilizados como discriminação de reação positiva. Um valor limite para a densidade óptica que discriminou a melhor coloração positiva em relação ao fundo foi obtido, e as configurações desse limiar foram gravados no programa. Todas as imagens foram analisadas pelo limiar gravado, a fim de excluir qualquer subjetividade. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias da densidade óptica e os dados gráficos representam os valores médios obtidos através da análise conjunta das imagens de CA1, CA2, CA3 e giro denteado da área hipocampal.

### *3.10 Drogas e reagentes*

As seguintes drogas e reagentes foram utilizadas: Triton X-100, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), aprotinina, leupeptina, pepstatina A,  $\beta$ -mercaptoetanol, pastilhas de PBS, tartarato de sódio e potássio ( $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ ), FOLIN-Ciocalteu Fenol e Nonidet P-40, todos obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Tris, acrilamida, glicerol e SDS (docedil sulfato de sódio) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); Entellan, ácido cítrico,  $MgCl_2$ , KCl e NaCl, sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) e deoxicolato de sódio (Merck, São Paulo, SP, Brasil); citrato de sódio, isopropanol, etanol, metanol, acetona, xilol, dimetilsulfóxido, azul de bromofenol, paraformaldeído e nitrato de prata (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); Hematoxilina de Harris (Newprov, Pinhais, PR, Brasil); peróxido de hidrogênio (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca);

### 3.11 *Análise estatística*

Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística dos experimentos comportamentais e moleculares foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de *post-hoc* Bonferroni. Valores de P menores que 0,05 (\*P < 0,05) foram considerados como indicativos de significância. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

### 3.12 *Protocolo Experimental*

O protocolo experimental foi conduzido como ilustrado na figura 6. As coletas para o experimento de imunoistoquímica ocorreram após a injeção de A $\beta$ <sub>1-40</sub>, nos tempos que compreendem o pico de expressão das proteínas estudadas, ou seja: de 6 h para p-JNK e p-ERK, 24 h para COX-2 e Iba-1, e 8 dias para iNOS, nNOS e sinaptofisina. O experimento de western blot foi realizado com os tecidos coletados 15 dias após a administração de A $\beta$ <sub>1-40</sub> com a finalidade relacionar a expressão das proteínas citadas anteriormente e de outras proteínas (B<sub>2</sub>R, P-p-38, P-c-Jun, p-65, PKC $\delta$  e PKC $\epsilon$ ) com os resultados obtidos nos testes comportamentais, minimizando o uso de animais. Adicionalmente a figura 7 ilustra o protocolo experimental adotado para a confirmação do efeito do HOE 140 sobre a toxicidade induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>, quando comparado a outros antagonistas do mesmo receptor e a sua capacidade de reverter o processo de toxicidade já instalado após a injeção do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>.

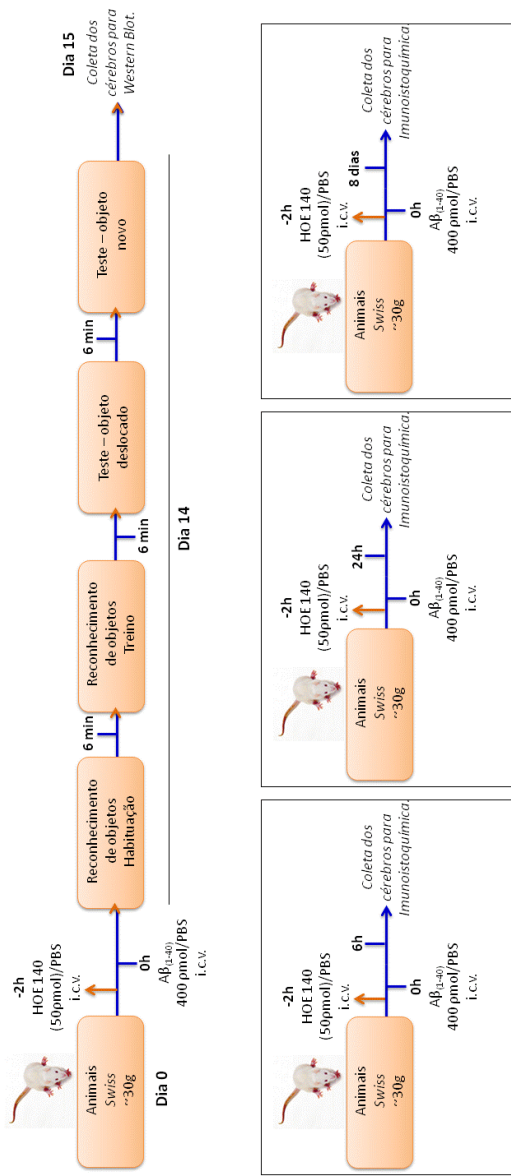
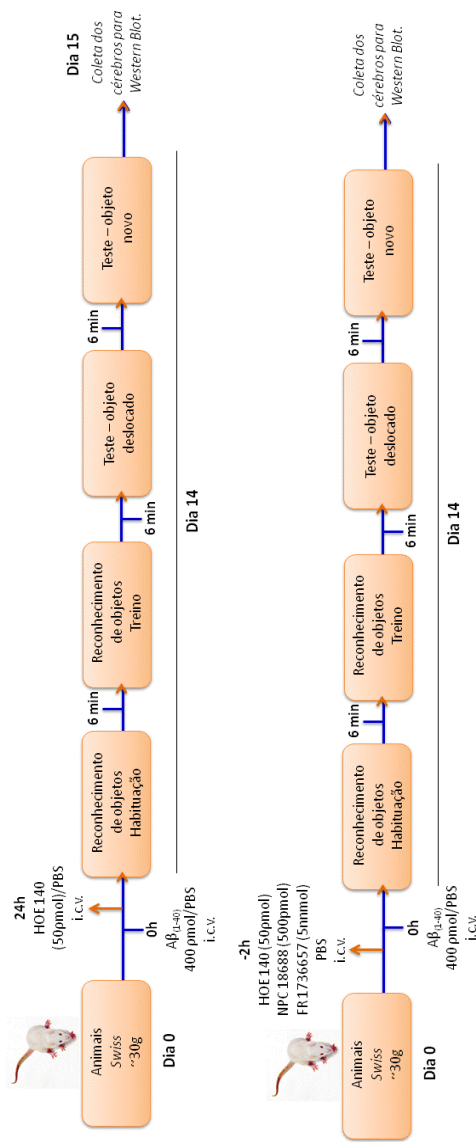


Figura 6 – Esquema representativo do protocolo experimental adotado no estudo. (i.c.v.)= intracerebroventricular;





**Figura 7 – Esquema representativo do protocolo experimental adotado no estudo.** (i.c.v.)= intracerebroventricular; HOE 140 = antagonista peptídico do receptor  $B_2$ ; NPC 18688 = antagonista pseudopeptídico do receptor  $B_2$ ; FR 173657= antagonista não-peptídico do receptor  $B_2$



## 4 RESULTADOS

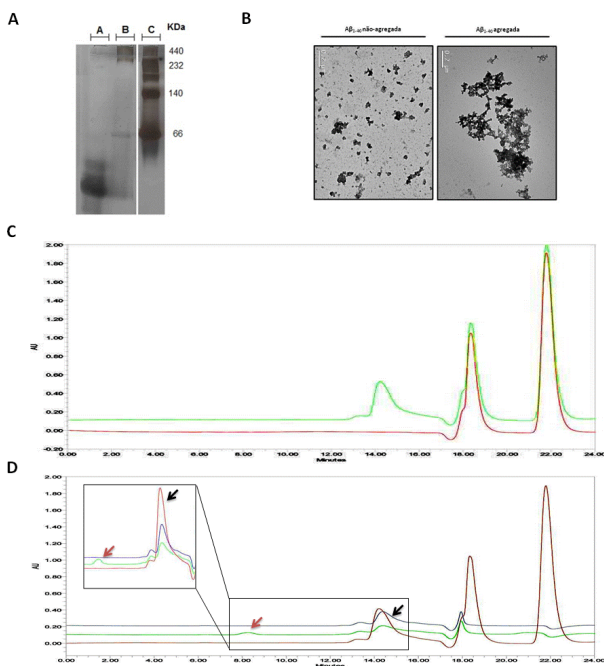
### 4.1 Estado de agregação do peptídeo $A\beta_{1-40}$ .

Ressuspendemos e induzimos a agregação do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , e através de três técnicas diferentes, eletroforese em gel nativo de poliacrilamida, cromatografia de exclusão por tamanho e microscopia eletrônica de transmissão (MET), confirmamos que o peptídeo  $A\beta$  realmente estava agregado. A figura 8A representa os resultados obtidos na eletroforese; como pode-se observar, o peptídeo que passou por processo de incubação (linha B) apresentou bandas com alto peso molecular (entre 420-350 kDa), indicando a presença de protofibrilas que apenas ocorrem quando o peptídeo está agregado e que podem variar entre 50-1,500 kDa. Observa-se também a presença de uma banda menos intensa com peso molecular de 66 kDa o que pode indicar a presença de oligômeros de baixo peso molecular (dímeros, tetrâmeros, pentâmeros, entre outros), as quais o peso molecular varia entre 42-80 kDa. Tais achados não foram observados para o peptídeo utilizado como controle (que passou por processo de ressuspensão, mas não foi incubado) (linha A), o qual apresentou duas bandas de baixo peso molecular, uma de menor intensidade e outra muito intensa (~ 50 e 40 kDa, respectivamente), o que indica a presença apenas de oligômeros de baixo peso molecular e formações oligoméricas de aproximadamente 10 monômeros (figura 8A).

As análises em MET revelaram que as protofibrilas, termo usado para descrever alguns agregados pré-fibrilares ( $\geq 4$  nm), são as formas mais frequentes nas nossas preparações. Como se observa na foto-micrografia eletrônica (figura 8B), o peptídeo que passou por processo de incubação (agregado) apresenta misturas heterogêneas de agregados com estruturas de diferentes tamanhos e morfologia esférica (5-20 nm). Estruturas suavemente anelares e ainda estruturas curvilíneas (5 nm de diâmetro e <200 nm de comprimento) também foram observadas. Não podemos afirmar a ausência de formação oligomérica, na verdade, nós reforçamos que a nossa preparação parece conter ambas as formas, principalmente pela forma que foi preparada; entretanto não podemos afirmar com certeza qual foi o

percentual de oligômeros ou formação de protofibrilas em nossas preparações. A análise MET da amostra não-agregada, utilizada como controle, mostra uma mistura de espécies de baixo peso molecular, incluindo dímeros, trímeros e tetrâmeros entre outros, sem evidências de que estas espécies se acumulam ou agregam em uma forma estável.

A outra estratégia utilizada foi a cromatografia de exclusão por tamanho, uma análise qualitativa, na qual observamos na figura 8C as corridas do padrão monomérico (1 mg/ml) (linha verde) e do branco (solvente utilizado para diluir o padrão) (linha vermelha), os quais apresentaram três picos distintos. O primeiro pico (linha verde) que elui entre 12-17 minutos, representa as formas oligoméricas de baixo peso molecular, que apenas o padrão apresenta, e, portanto, é o pico de interesse. Os dois outros picos coincidentes (linha verde e vermelha), que eluem mais tarde entre 18-20 minutos (o primeiro) e 22-24 minutos (o segundo), representam a absorção das moléculas do solvente utilizado. Na figura 8D verifica-se que a amostra de estudo (que passou por processo de incubação) (linha verde), apresenta dois picos cromatográficos, um que elui entre 7-9 minutos e outro que elui entre 12-17 minutos. O mesmo não foi observado na amostra “não-agregada” (linha azul) que apresenta apenas um pico que elui entre 12-17 minutos. Este pico entre 12 e 17 minutos, também presente nas amostras agregada (linha verde), não-agregada (linha azul) e no padrão monomérico (linha vermelha) indicam a presença de oligômeros de baixo peso molecular, em todas as preparações. É interessante notar que a amostra do estudo (agregada) apresenta estes mesmos oligômeros de baixo peso molecular (que eluíram mais tarde), porém, provavelmente apresenta também oligômeros de alto peso molecular como protofibrilas. Sugere-se isso com base na presença do pico que eluiu primeiro (entre 7-9 minutos), já que são maiores em tamanho e peso molecular. Apoiando-se nos dados obtidos nas três técnicas empregadas, confirmamos que a nossa preparação de peptídeos A $\beta$ <sub>1-40</sub> realmente agregou-se e estava apta para uso em animais.

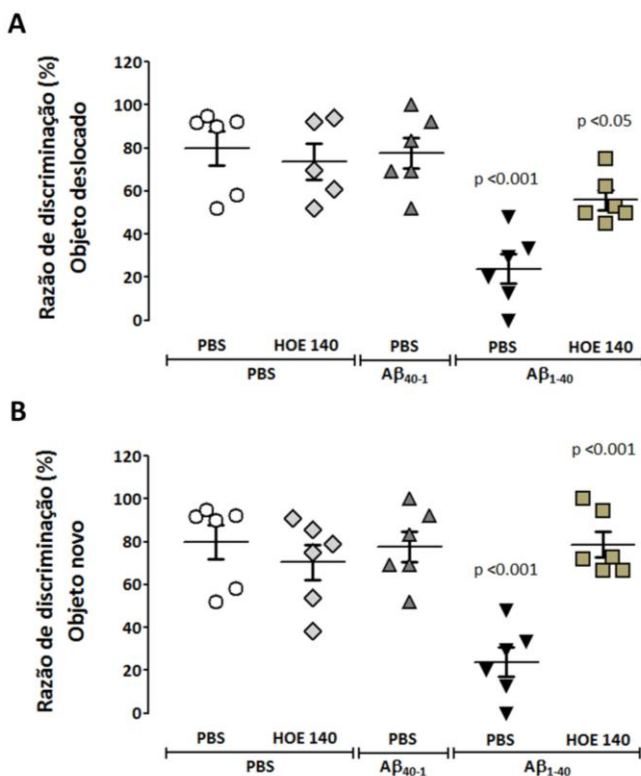


**Figura 8 – Confirmação do estado de agregação do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>.** (A) Imagem representativa da corrida por eletroforese em gel nativo de poliacrilamida 40%, mostrando a Aβ<sub>1-40</sub> não-agregada (ressuspensa e sem o processo de incubação) (linha A), Aβ<sub>1-40</sub> agregada (ressuspensa e incubada a 37°C durante 4 dias) (linha B) e o padrão de frações de albumina (linha C), utilizado como padrão de peso molecular. (B) Fotomicrografias obtidas através de análise em MET, representam a Aβ<sub>1-40</sub> agregada, (painel direito) e a Aβ<sub>1-40</sub> não-agregada (painel esquerdo). Cromatogramas representativos das análises qualitativas realizadas em CLAE de exclusão por tamanho, mostrando (C) a comparação do padrão monomérico (linha verde) e branco (solvente utilizado para a diluição do padrão) (linha vermelha); (D) e a comparação entre o padrão monomérico (linha vermelha), a Aβ<sub>1-40</sub> não-agregada (linha azul) e a Aβ<sub>1-40</sub> agregada (linha verde). O insert da figura (D) apresenta os picos de interesse no cromatograma em maior ampliação. As setas de cor preta indicam o pico de oligômeros de baixo peso molecular, e as setas em vermelho o pico provável de oligômeros de alto peso molecular. Todas as amostras foram obtidas em um espectro de absorção de 210 nm e estavam na concentração de 1mg/ml.

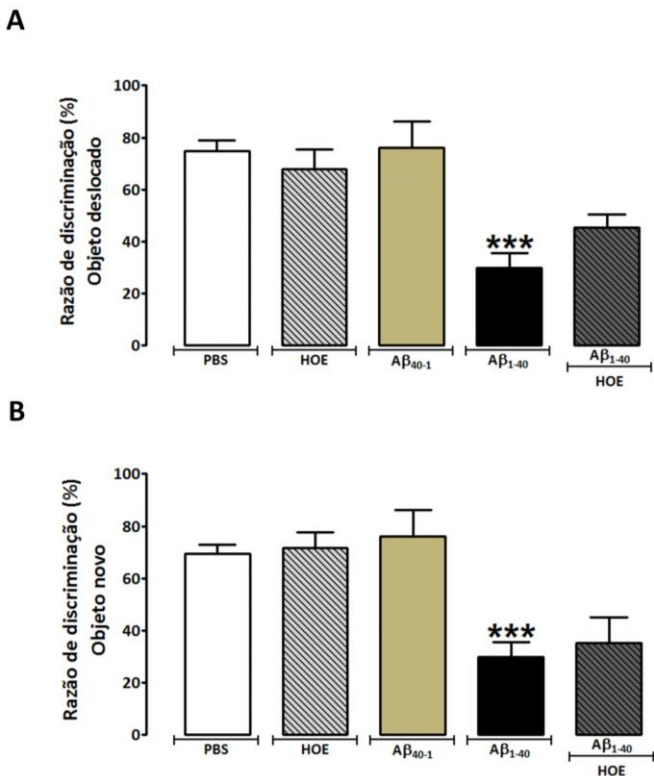
#### 4.2 *Papel do receptor B<sub>2</sub> para as cininas no prejuízo cognitivo induzido pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>*

Neste bloco de experimentos procuramos confirmar dados anteriores da literatura a respeito do envolvimento do receptor B<sub>2</sub> no prejuízo cognitivo induzido por Aβ. Para tanto utilizamos o teste do reconhecimento de objetos. Observamos neste teste que a injeção do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos induziu dano cognitivo após 14 dias quando comparado ao grupo injetado com PBS (controle), conforme indicado pela diminuição no tempo de exploração do objeto deslocado (figura 9A), ou do objeto novo (figura 9B), em relação ao tempo de exploração do objeto antigo. No presente estudo também verificamos que o pré-tratamento com HOE 140 (50 pmol/sítio), 2 horas antes da administração de Aβ<sub>1-40</sub>, preveniu o dano cognitivo induzido pelo peptídeo, visto que os animais apresentaram maior tempo de exploração dos objetos deslocado (figura 9A) e novo (figura 9B), em relação ao tempo de exploração do objeto antigo, com um perfil similar aos animais controle. Adicionalmente realizamos também um protocolo no qual o antagonista HOE 140 (50 pmol/sítio) foi administrado 24 h após a injeção do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>, a fim de avaliar se o bloqueio do receptor B<sub>2</sub> após a toxicidade induzida pelo peptídeo seria capaz modular o processo citotóxico já iniciado. Observa-se na figura 10 que o antagonista do receptor B<sub>2</sub>, o HOE 140, não promoveu nenhuma alteração no dano cognitivo induzido pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> quando injetado 24h após a administração do mesmo, como demonstrado no teste com o objeto deslocado (figura 10A) e com o objeto novo (figura 10B).

É importante ressaltar que a administração i.c.v. do antagonista do receptor B<sub>2</sub>, o HOE 140 não resultou em qualquer alteração significativa na cognição *per se*. Ainda, deve-se mencionar que os efeitos da administração de Aβ<sub>1-40</sub> sobre o desempenho nos testes comportamentais não estavam relacionados com a deficiência motora, visto que não foram observadas alterações significativas nos cruzamentos e levantamentos no teste do campo aberto (resultados não mostrados).



**Figura 9 – O bloqueio do receptor  $B_2$  previne o déficit cognitivo induzido pela administração i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos. (A e B) Teste de reconhecimento de objetos realizado com animais *Swiss* 14 dias após a administração i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  (400pmol/sítio): (A) porcentagem da razão de discriminação entre o objeto habitual e o objeto deslocado, (B) porcentagem da razão de discriminação entre o objeto habitual e o objeto novo. O antagonista do receptor  $B_2$  para as cininas, HOE 140 (50  $\mu$ mol/sítio), foi administrado por via i.c.v., 2 horas antes do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (N=6/grupo). O grupo PBS/ $A\beta_{1-40}$  foi comparado ao animal PBS/PBS. O grupo HOE 140/ $A\beta_{1-40}$  foi comparado ao grupo PBS/ $A\beta_{1-40}$ .**

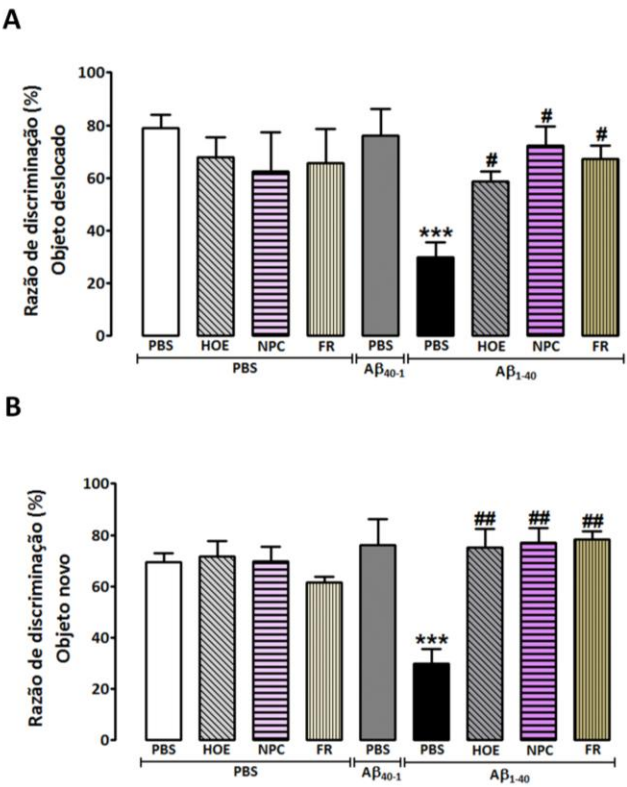


**Figura 10 – O tratamento com o antagonista HOE 140 não altera o déficit cognitivo induzido pela administração i.c.v. do peptídeo A $\beta_{1-40}$  em camundongos. (A e B) Teste de reconhecimento de objetos realizado com animais *Swiss* 14 dias após a administração i.c.v. do peptídeo A $\beta_{1-40}$  (400pmol/sítio): (A) porcentagem da razão de discriminação entre o objeto habitual e o objeto deslocado, (B) porcentagem da razão de discriminação entre o objeto habitual e o objeto novo. O antagonista do receptor B2 para as cininas, HOE 140 (50  $\mu$ mol/sítio), foi administrado por via i.c.v. 24 horas após o peptídeo A $\beta_{1-40}$ . Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (N=8/grupo). \*\*\*P < 0,001 quando comparado ao grupo controle (PBS).**



#### 4.3 *Papel dos diferentes antagonistas do receptor B<sub>2</sub> para as cininas sobre o prejuízo cognitivo induzido pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>.*

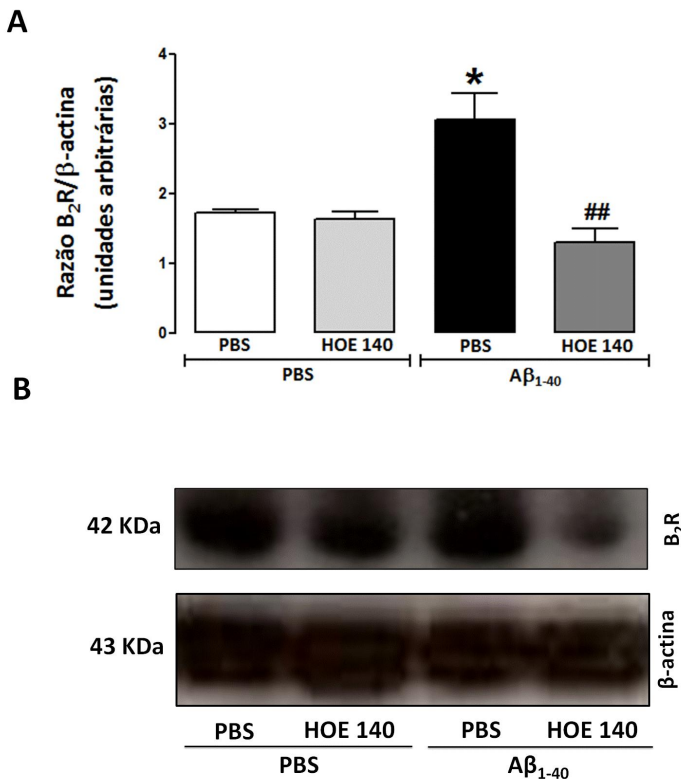
Com o intuito de confirmar a participação do receptor B<sub>2</sub> para as cininas na toxicidade induzida pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> através de sua ativação no processo inicial desencadeado por este peptídeo adotamos um protocolo de tratamento diferenciado para a realização do teste do reconhecimento de objetos. Neste bloco de experimentos realizamos o pré-tratamento (2 h antes da injeção do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>) dos animais com os diferentes antagonistas do receptor B<sub>2</sub>: o HOE 140 (50 pmol/sítio), um antagonista peptídico, o NPC 18688 (500 pmol/sítio), um antagonista pseudopeptídico e o FR 173657 (5 nmol/sítio), um antagonista não peptídico. Observamos na figura 11 que o pré-tratamento com os diferentes antagonistas: o HOE 140, o NPC 18688 e o FR 173657, 2 horas antes da administração de Aβ<sub>1-40</sub>, preveniu o dano cognitivo induzido pelo peptídeo, visto que os animais apresentaram maior tempo de exploração dos objetos deslocado (figura 11A) e novo (figura 11B), em relação ao tempo de exploração do objeto antigo, com um perfil similar aos animais controle. Nenhum dos tratamentos i.c.v. dos antagonistas do receptor B<sub>2</sub> *per se* resultou em qualquer alteração significativa na cognição.



**Figura 11 – O bloqueio do receptor B<sub>2</sub>, com os diferentes antagonistas, previne o déficit cognitivo induzido pela administração i.c.v. do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.** (A e B) Teste de reconhecimento de objetos realizado com animais Swiss 14 dias após a administração i.c.v. do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> (400pmol/sítio): (A) porcentagem da razão de discriminação entre o objeto habitual e o objeto deslocado, (B) porcentagem da razão de discriminação entre o objeto habitual e o objeto novo. Os antagonistas do receptor B2 para as cininas, o HOE 140 (50 pmol/sítio), o NPC 18688 (500 pmol/sítio) e o FR 173657 (5 nmol/sítio) foram administrados por via i.c.v, 2 horas antes da administração do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. Os dados representam a média ± E.P.M. (N=8/grupo). \*\*\*P < 0,001; quando comparado ao grupo controle (PBS). #P < 0,05; ##P < 0,01 quando comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>.

#### 4.4 *Efeito da injeção do peptídeo $A\beta_{1-40}$ sobre a expressão do receptor $B_2$ no cérebro e análise da possível auto-regulação deste receptor.*

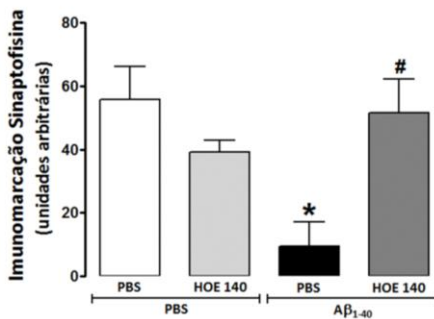
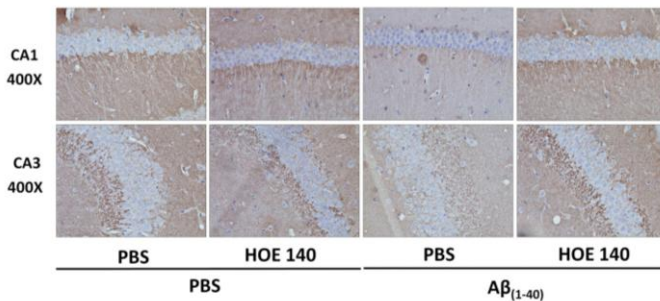
Com o intuito de avaliar os níveis de expressão de proteína para o receptor  $B_2$  após a injeção do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  e se o tratamento com o antagonista para o receptor  $B_2$  (HOE 140) seria capaz de modular a expressão do seu próprio receptor, amostras de hipocampo coletadas 15 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$  (400  $\mu\text{mol/sítio}$ , i.c.v) foram submetidas à imunodeteção por western blot. Como demonstrado na Figura 12, observou-se aumento significativo na expressão do receptor  $B_2$  (aumento de 77%), quando comparado a injeção de PBS nos grupos controles ( $p < 0,001$ ) (figura 12A e B). Relevantemente, 15 dias após a injeção de  $A\beta$ , pode-se verificar que os animais que foram tratados previamente com o antagonista do receptor  $B_2$ , o HOE 140 (50  $\mu\text{mol/sítio}$ ), apresentaram diminuição significativa da expressão deste receptor (100%) (figura 12A e B), demonstrando que o pré-tratamento com o antagonista é capaz de modular a expressão do próprio receptor, o que indica um mecanismo de auto-regulação para o receptor  $B_2$  neste modelo.



**Figura 12 – O antagonista do receptor B<sub>2</sub> o HOE 140 modula o aumento da expressão do próprio receptor, induzida pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.** Animais receberam injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/sítio) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/sítio, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. **(A)** O gráfico representa a razão entre valores médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do western blot para o receptor B<sub>2</sub>, corrigidos pelo valor do controle genômico β-actina, após 15 dias da administração de Aβ<sub>1-40</sub>. **(B)** Imagens ilustrativas das bandas obtidas por western blot para o receptor B<sub>2</sub> (42 KDa) e para o controle genômico β-actina (43kDa). Os valores estão expressos como a média ± E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*P < 0,05; quando comparado ao grupo controle (PBS). ##P < 0,01; quando comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>.

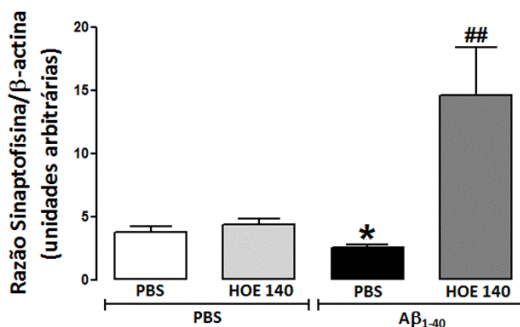
#### 4.5 Envolvimento do receptor $B_2$ na disfunção sináptica induzida pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$ .

O prejuízo da integridade sináptica induzido pela injeção i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/sítio) foi analisado através da expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina e da proteína pós-sináptica domínio pós-sináptico 95 (PSD-95, do inglês *post-synaptic domain-95*). Como ilustrado na figura 13, o nível de detecção da proteína pré-sináptica sinaptofisina no hipocampo dos animais tratados com  $A\beta_{1-40}$  foi significativamente menor, quando comparado com os animais que receberam o veículo (PBS) por via i.c.v. Tal efeito foi evidenciado através da quantificação da intensidade da coloração castanha nas sub-regiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e GD analisadas por imunoistoquímica 8 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$ , revelando redução de 82% (figura 13A e B) e através da imunodeteção por western blot no hipocampo dos animais injetados com  $A\beta_{1-40}$  após 15 dias (redução de 32%) (figura 14A e B). Estes dados corroboram dados anteriormente demonstrados por nosso grupo, em que uma única injeção de  $A\beta_{1-40}$  é capaz de reduzir os níveis de expressão da proteína sinaptofisina (PASSOS et al., 2010; BICCA et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2011). De acordo com os resultados dos testes comportamentais, o tratamento prévio i.c.v. dos animais com o HOE 140 (50 pmol/sítio), preveniu o dano sináptico induzido pela administração i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ , como demonstrado pela maior expressão da proteína sinaptofisina no hipocampo, tanto por imunoistoquímica (prevenção de 74%), quanto por western blot (prevenção de 100%) (figura 13 e 14). Adicionalmente, realizamos também a imunodeteção de PSD-95 por western blot, e como pode-se observar na figura 15A e B, os níveis de expressão desta proteína estão diminuídos 15 dias após a administração do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , quando comparado ao grupo controle (prejuízo de 23%). Interessantemente, constatamos que no grupo tratado previamente com o antagonista HOE 140 (50 pmol/sítio, i.c.v.) ocorreu prevenção total desta alteração.

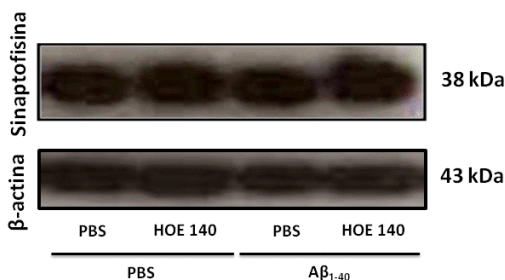
**A****B**

**Figura 13 - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor  $B_2$  previne a perda sináptica induzida pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos.** Os animais receberam injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/sítio) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/sítio, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  ou com seu veículo (PBS). **(A)** Medida da densidade óptica da imunoreatividade para sinaptofisina avaliada por imunistoquímica nas diferentes sub-regiões do hipocampo (CA1, CA2, CA3 e GD) 8 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$  e expressa em unidades arbitrárias. **(B)** Imagens representativas da reação de imunistoquímica para sinaptofisina na sub-região CA1 e CA3 (aumento de 400 vezes). Os valores estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*P < 0,05; quando comparado ao grupo controle (PBS). #P < 0,05; quando comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$ .

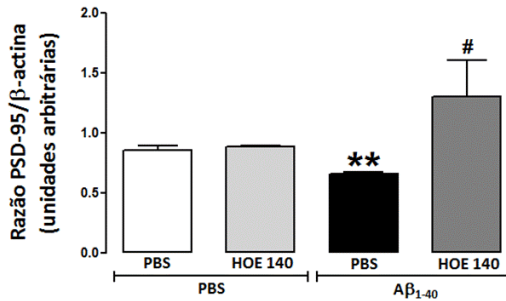
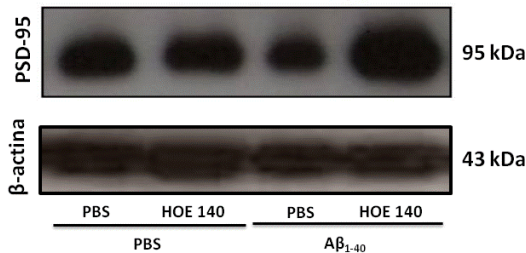
A



B



**Figura 14 - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub> previne a diminuição na expressão da sinaptofisina induzida pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.** Os animais receberam injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/sítio) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/sítio, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> ou com seu veículo (PBS). (A) O gráfico representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína sinaptofisina e o controle genômico β-actina, avaliado por western blot, 15 dias após a injeção de Aβ<sub>1-40</sub> e expresso em unidades arbitrárias. (B) Imagens ilustrativas das bandas obtidas por imunodeteção para a proteína sinaptofisina (38kDa) e para o controle genômico β-actina (43kDa). Os valores estão expressos como a média ± E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*P < 0,05; quando comparado ao grupo controle (PBS). ##P < 0,01; quando comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>.

**A****B**

**Figura 15 - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor  $B_2$  previne a diminuição na expressão da PSD-95 induzida pelo tratamento i.c.v. com o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos.** Os animais receberam injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/sítio) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/sítio, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  ou com seu veículo (PBS). **(A)** O gráfico representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína PSD-95 e o controle genômico  $\beta$ -actina, avaliado por western blot, 15 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$  e expresso em unidades arbitrárias. **(B)** Imagens ilustrativas das bandas obtidas por imunodeteção para a proteína PSD-95 (95kDa) e para o controle interno  $\beta$ -actina (43kDa). Os valores estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. (N = 3-5/grupo). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  quando comparado ao grupo controle (PBS). # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,01$  quando comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$ .

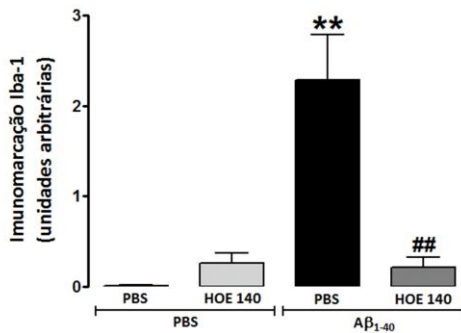


#### 4.6 *Envolvimento do receptor B<sub>2</sub> no processo inflamatório induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> no hipocampo de camundongos.*

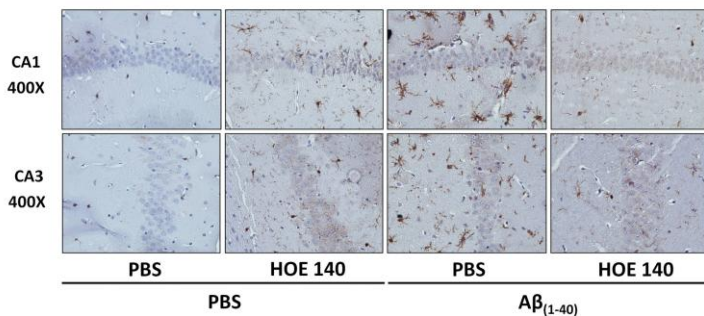
Dispostos a verificar a participação do receptor B<sub>2</sub> no processo inflamatório induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>, avaliamos a ativação/migração de células microgliais, bem como o aumento da expressão da enzima COX-2, os quais foram anteriormente caracterizados por nosso grupo neste modelo experimental (PASSOS et al., 2009; MEDEIROS et al., 2010).

Inicialmente foi avaliada a possível participação do receptor B<sub>2</sub> na ativação/migração de microglias no hipocampo através das técnicas de imunoistoquímica e western blot para a proteína Iba-1 (um marcador específico da ativação e/ou migração de microglias). Os experimentos de imunoistoquímica e de western blot foram realizados 24 h e 15 dias após a injeção i.c.v. do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> ou veículo (PBS), respectivamente. Neste estudo, verificamos através de imunoistoquímica que os hipocampus obtidos de animais controle apresentaram marcação basal para Iba-1 nas sub-regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD) (figura 16A e B). A administração de A $\beta$ <sub>1-40</sub> resultou em aumento significativo na imunoreatividade para Iba-1 nas diferentes regiões do hipocampo (figura 16A e B). Resultados semelhantes foram observados através da técnica de western blot (figura 17A e B). Para verificar o possível envolvimento do receptor B<sub>2</sub> sobre as alterações microgliais causadas pela injeção i.c.v. de A $\beta$ <sub>1-40</sub>, os animais foram pré-tratados com HOE 140 (50 pmol/sítio, i.c.v.), 2 horas antes da injeção do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Os resultados do presente estudo mostram que o pré-tratamento com HOE 140 foi capaz de prevenir o aumento da ativação/migração de células microgliais no hipocampo de camundongos com inibição de 90%, evidenciada tanto por imunoistoquímica (figura 16A e B), quanto por western blot (figura 17A e B).

A

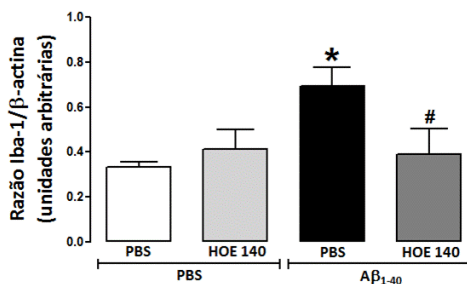


B

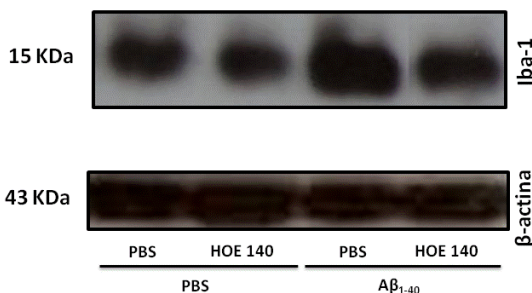


**Figura 16 - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub> previne o aumento na ativação de células microgliais induzida pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.** Animais receberam injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/camundongo, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. **(A)** Medida da densidade óptica da imunoreatividade da proteína Iba-1 avaliada em duas sub-regiões do hipocampo (CA1 e CA3) e expressa em unidades arbitrárias. **(B)** Imagens representativas da reação de imunoistoquímica para a proteína Iba-1, analisada nas sub-regiões do hipocampo citadas anteriormente (A), 24 horas após a administração i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> (aumento de 400 vezes). Os valores estão expressos como a média ± E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*\*P < 0,01; quando comparado ao grupo controle (PBS). ##P < 0,01; quando comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>.

A

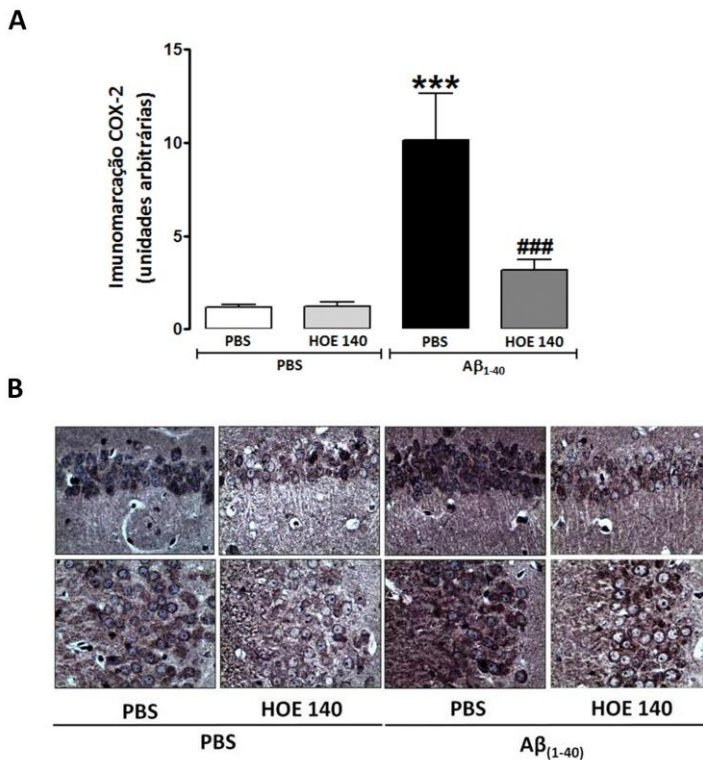


B

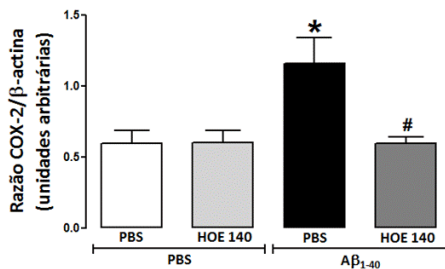
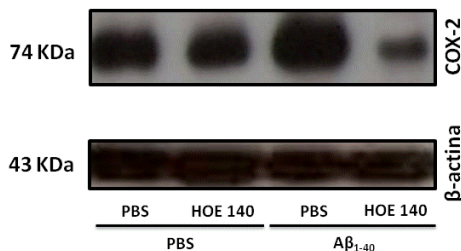


**Figura 17 - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor  $B_2$  previne o aumento na expressão de células microgлияis ativadas induzida pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos.** Animais receberam injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/camundongo, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . **(A)** Dados médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do western blot para proteína Iba-1, corrigidos pelo valor do controle genômico  $\beta$ -actina, 15 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$ . **(B)** Imagens ilustrativas das bandas obtidas por imunodeteção para a Iba-1 (15 KDa) e para o controle genômico  $\beta$ -actina (43kDa). Os valores estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*P < 0,05; quando comparado ao grupo controle (PBS). # P < 0,05; quando comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$ .

Para verificar a possível participação do receptor  $B_2$  no aumento de expressão da COX-2, avaliamos o nível de expressão desta enzima através das técnicas de imunoistoquímica e de western blot, em tecidos coletados 24 horas e 15 dias após o tratamento com  $A\beta_{1-40}$ , respectivamente (figura 18 e 19). Através de imunoistoquímica (figura 18A e B) e de western blot (figura 19C e D), verificou-se que o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  induziu aumento significativo na expressão da enzima COX-2 no hipocampo (aumento de ~96%). De forma significativa, o pré-tratamento com HOE 140 preveniu a indução da expressão da COX-2 em 24 horas (figura 18A e B) e 15 dias (figura 19A e B) após administração do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , com redução de 64% e 100%, respectivamente. Em conjunto, estes resultados sugerem que os efeitos benéficos do pré-tratamento com HOE 140 sobre os danos cognitivos e sinápticos (figura 9, 11, 13, 14, 15) induzidos pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , parecem estar associados com a redução da ativação de células microgliais e redução da expressão da enzima COX-2.



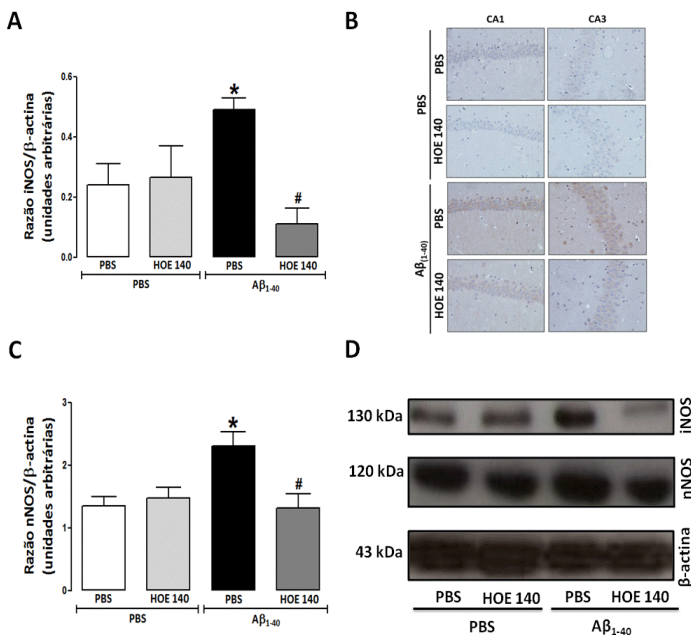
**Figura 18 - O pré-tratamento com antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub> previne o aumento na expressão da enzima COX-2 induzida pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.** Animais receberam injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> (400 μmol/camundongo) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 μmol/camundongo, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. **(A)** Medida da densidade óptica da imunoreatividade para a COX-2, avaliada nas diferentes sub-regiões CA1 e CA3 do hipocampo e expressas em unidades arbitrárias. **(B)** Imagens representativas da reação de imunoistoquímica para a enzima COX-2, analisadas nas sub-regiões do hipocampo, 24 horas após a administração i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> (aumento de 400 vezes). Os valores estão expressos como a média ± E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*\*\*P < 0,001; quando comparado ao grupo controle (PBS). ###P < 0,001; quando comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>.

**A****B**

**Figura 19 – O bloqueio do receptor B<sub>2</sub> com antagonista seletivo, o HOE 140, previne o aumento na expressão da enzima COX-2 induzida pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.** Animais receberam injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/camundongo, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. **(A)** Dados médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do western blot para enzima COX-2, corrigidos pelo valor do controle genômico β-actina, 15 dias após a injeção de Aβ<sub>1-40</sub>. **(B)** Imagens ilustrativas das bandas obtidas por imunodeteção para a COX-2 (74 KDa) e para o controle genômico β-actina (43kDa). Os valores estão expressos como a média ± E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*P < 0,05; quando comparado ao grupo controle (PBS). # P < 0,05; quando comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>.

4.7 *Participação do receptor B<sub>2</sub> no aumento da expressão das enzimas produtoras de NO induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> no hipocampo de camundongos.*

A fim de elucidar a participação do receptor B<sub>2</sub> sobre a indução da expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), os animais receberam pré-tratamento com HOE 140 (50 pmol/sítio, i.c.v.) 2 horas antes do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Avaliamos através da técnica de imunoistoquímica e de western blot, o nível de expressão das enzimas produtoras de óxido nítrico 8 e 15 dias após o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub>, respectivamente. Os dados da figura 13 revelam que uma única injeção de A $\beta$ <sub>1-40</sub> (400 pmol/sítio, i.c.v.) induz aumento na expressão de ambas as enzimas produtoras de NO avaliadas, a iNOS, apresentando um aumento de 100% (figura 20A, B e D), após 8 e 15 dias e a nNOS, com aumento de 70% (figura 20C e D), após 15 dias. O pré-tratamento com HOE 140 foi capaz de prevenir completamente (100%) a indução da expressão da iNOS e nNOS após tratamento com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> (figura 20). Estes dados nos fornecem indícios de que o receptor B<sub>2</sub> possui também papel importante no bloqueio da toxicidade de A $\beta$ <sub>1-40</sub> que leva a produção de NO, um agente contribuinte tanto para a modulação vascular quanto para a formação de espécies reativas de oxigênio e no processo inflamatório.



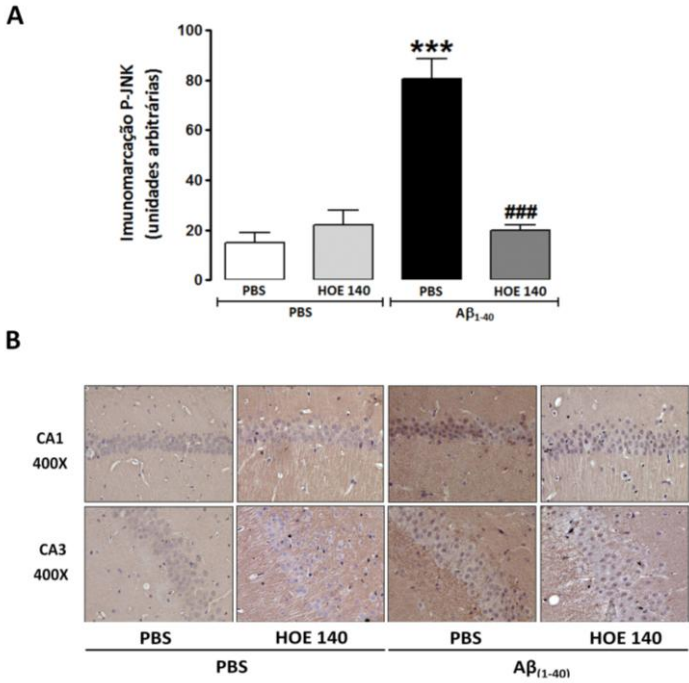
**Figura 20 - O pré-tratamento com HOE 140 previne o aumento da expressão das enzimas iNOS e nNOS induzido pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.** Animais foram administrados i.c.v. com Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/camundongo, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. **(A)** Dados médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do western blot para a enzima iNOS, corrigidos pelo valor do controle interno β-actina, 15 dias após a injeção de Aβ<sub>1-40</sub>. **(B)** Imagens representativas da imunoistoquímica para iNOS nas sub-regiões CA1 e CA3 do hipocampo dos camundongos sacrificados 8 dias após injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub>, em aumento de 400 vezes. **(C)** Dados médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do western blot para a enzima nNOS, corrigidos pelo valor do controle genômico β-actina, 15 dias após a injeção de Aβ<sub>1-40</sub>. **(D)** Imagens ilustrativas das bandas obtidas por imunodeteção para a iNOS (130KDa), nNOS (120KDa) e para o controle genômico β-actina (43kDa). Os valores estão expressos como a média ± E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*P < 0,05; quando comparado ao grupo controle (PBS). # P < 0,05; quando comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>.



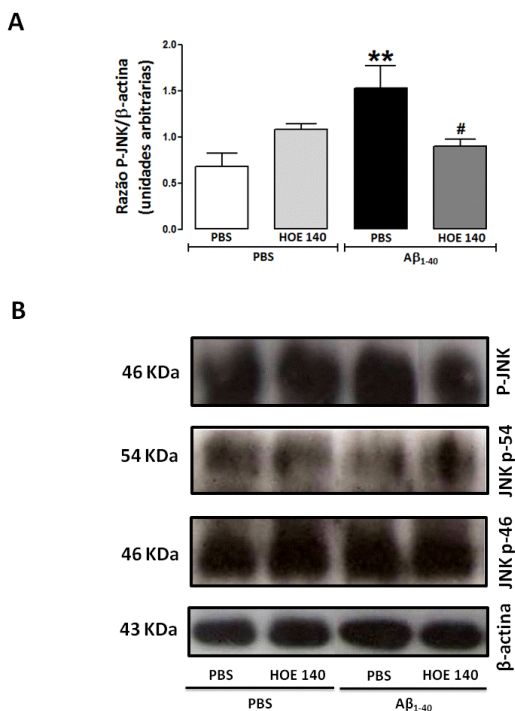
#### 4.8 *Caracterização do envolvimento do receptor B<sub>2</sub> na ativação das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKS) e suas vias de sinalização na neuroinflamação induzida pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>.*

Evidências recentes indicam que as proteínas quinases ativadas por mitógeno apresentam importante papel na disfunção neuronal observada na doença de Alzheimer. Neste sentido, foi avaliada a participação do receptor B<sub>2</sub> para as cininas sobre o aumento da expressão das MAPKS (JNK, MAPK/ERK e p-38/MAPK) e duas de suas vias de sinalização (c-Jun e NF $\kappa$ -B) induzido pelo peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Conforme demonstrado através da técnica de imunoistoquímica, o tratamento com A $\beta$ <sub>1-40</sub> promoveu o aumento na expressão superior a 100% da JNK fosforilada (P-JNK) no hipocampo dos animais após 6 horas do tratamento (figura 21A e B), esse nível ainda apresenta-se elevado após 15 dias como demonstrado através da técnica de western blot (figura 22A e B).

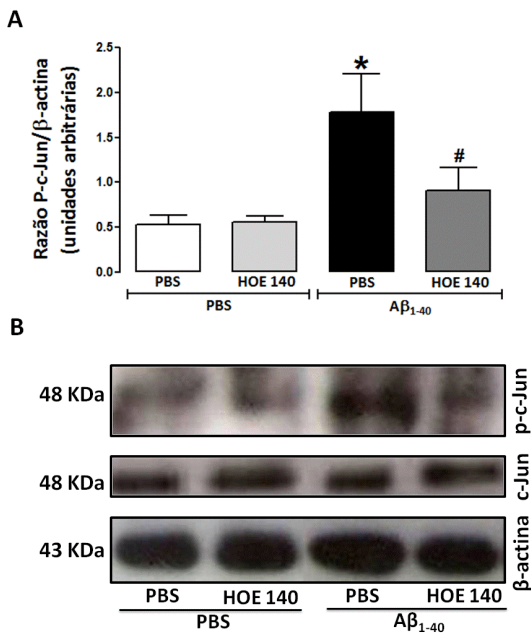
Uma das vias ativadas por P-JNK é a que resulta na fosforilação de c-Jun (P-c-Jun). Portanto, procuramos avaliar o envolvimento de P-c-Jun nos efeitos protetores exercidos pelo antagonismo do receptor B<sub>2</sub> no presente modelo experimental. Conforme demonstrado na figura 23A e B, o peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> induziu (após 15 dias) a fosforilação da proteína c-Jun. De maneira relevante, o pré-tratamento dos animais com o HOE-140 reduziu a fosforilação da P-JNK em aproximadamente 85% (figura 21) e consequente a fosforilação de c-Jun, apresentando uma redução de 78% (figura 23A), quando avaliados por western blot. Este resultado evidencia a participação do receptor B<sub>2</sub> na ativação da via JNK/c-Jun.



**Figura 21 - O pré-tratamento com HOE 140 previne o aumento da expressão da proteína JNK fosforilada (P-JNK) induzido pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.** Animais foram administrados i.c.v. com Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/sítio) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/sítio, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. **(A)** Medida da densidade óptica da imunistoquímica para a proteína P-JNK avaliada nas diferentes sub-regiões do hipocampo (CA1 e CA3) dos camundongos, expressa em unidades arbitrárias. **(B)** Imagens representativas da imunodeteccção por imunistoquímica da P-JNK nas sub-regiões CA1 e CA3 do hipocampo dos camundongos sacrificados 6 horas após injeção i.c.v. de Aβ<sub>1-40</sub> (aumento de 400 vezes). Os valores estão expressos como a média ± E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*\*\*P < 0,001; quando comparado ao grupo controle (PBS). ### P < 0,001; quando comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>.

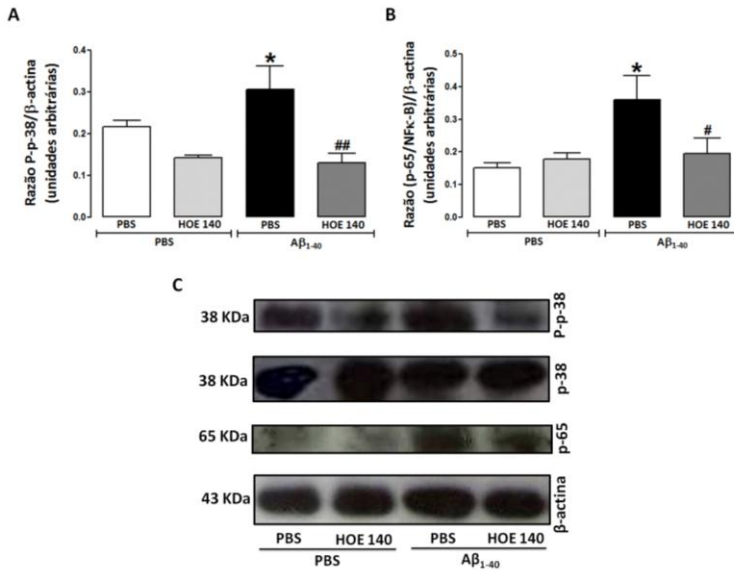


**Figura 22 - O bloqueio do receptor  $B_2$  com antagonista seletivo, o HOE 140, previne o aumento da expressão da proteína JNK fosforilada (P-JNK) induzido pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos.** Animais foram administrados i.c.v. com  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/sítio) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/sítio, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . **(A)** Dados médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do western blot para a proteína P-JNK, corrigidos pelo valor do controle genômico  $\beta$ -actina e comparados com os valores totais de JNK, 15 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$ . **(B)** Imagens ilustrativas das bandas obtidas por western blot para JNK total: JNK porção 46; p-46 (46 KDa), JNK porção 54; p-54 (54 KDa), para a P-JNK (46 KDa) e para o controle genômico  $\beta$ -actina (43kDa). Os valores estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*\*P < 0,01; quando comparado ao grupo controle (PBS). # P < 0,05; quando comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$ .



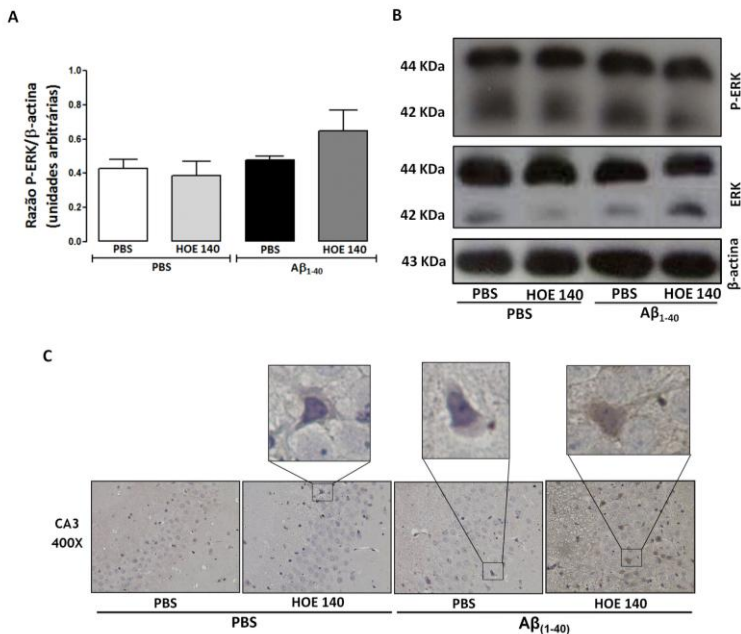
**Figura 23 - O pré-tratamento com HOE 140 previne o aumento da fosforilação do c-Jun (P-c-Jun) induzido pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos.** Animais foram administrados i.c.v. com  $A\beta_{1-40}$  (400  $\mu$ mol/sítio) ou PBS (veículo). Alguns grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50  $\mu$ mol/sítio, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . **(A)** Dados médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, da imunodeteção por western blot da proteína P-c-Jun, corrigidos pelo valor do controle genômico  $\beta$ -actina e comparados com os valores totais de c-Jun, 15 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$ . **(B)** Imagens ilustrativas das bandas obtidas por western blot para o c-Jun (total) (48 KDa), P-c-Jun (48 KDa) e para o controle genômico  $\beta$ -actina (43kDa). Os valores estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*P < 0,05; quando comparado ao grupo controle (PBS). # P < 0,05; quando comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$ .

Em uma segunda abordagem, a fim de investigar o possível envolvimento do receptor  $B_2$  para as cininas na via de sinalização da MAPK/p-38 ativada pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , foi efetuado western blot, nos hipocampus dos animais, 15 dias após o tratamento i.c.v. com  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/sítio). Dois grupos de animais receberam uma única injeção i.c.v. do antagonista seletivo do receptor  $B_2$ , o HOE 140 (50 pmol/sítio), 2 horas antes da administração do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . Nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente aumento na expressão da proteína MAPK/p-38, 6h após a administração de  $A\beta_{1-40}$  (MEDEIROS et al., 2010). Pode-se constatar na figura 24A, que ocorre aumento de 42% da expressão de p-38 fosforilada (P-p-38) nos animais que receberam o peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , comparados ao grupo controle, sem ocorrer alterações na expressão total de p-38 (figura 19C). Sabe-se que após a fosforilação da p-38, um dos mecanismos celulares ativados por esta proteína é a ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ -B. Como observado na figura 24B, o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  induz da mesma forma, aumento de 100% na expressão da proteína p-65 – (subunidade da proteína NF $\kappa$ -B, ativada pela P-p-38) quando comparado ao grupo controle. De modo notável, o antagonista do receptor  $B_2$ , o HOE 140, preveniu totalmente o aumento da expressão de P-p-38, bem como, reduziu em 90% o aumento de p-65, quando avaliado 15 dias após a injeção i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  (figura 24). Tais achados nos sugerem que esta via de sinalização (p-38/NF $\kappa$ -B) envolvida na toxicidade induzida por  $A\beta_{1-40}$ , também é modulada via receptor  $B_2$ .



**Figura 24 - O pré-tratamento com HOE 140 previne o aumento da expressão da proteína fosforilada p-38 (P-p-38) e p-65 (p-65/NF $\kappa$ -B) induzido pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos.** Animais foram administrados i.c.v. com  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/sítio) ou PBS (veículo). Dois grupos experimentais foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/sítio, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . Dados médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do western blot para a P-p-38 (**A**) e para a p-65/NF $\kappa$ -B (**B**), corrigidos pelo valor do controle genômico  $\beta$ -actina, 15 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$ , e no caso da P-p-38 comparados aos valores totais de p-38. (**C**) Imagens representativas das bandas obtidas por western blot para a p-38 (total) (38 KDa), P-p-38 (38 KDa), p-65 (65 KDa) e para o controle genômico  $\beta$ -actina (43kDa). Os valores estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*P < 0,05; quando comparado ao grupo controle (PBS). # P < 0,05; ## P < 0,01; quando comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$ .

Finalmente, com o intuito de avaliar a participação do receptor  $B_2$  na ativação de ERK/MAPK induzida por  $A\beta_{1-40}$ , realizamos sob as mesmas condições citadas anteriormente, o western blot para a proteína ERK total e sua porção fosforilada (P-ERK), empregando a técnica de imunoistoquímica e de western blot, 6 horas e 15 dias após a administração de  $A\beta_{1-40}$ , respectivamente. Observa-se na figura 25 que o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  não induziu nenhuma alteração significativa na expressão da ERK, quando comparado ao grupo controle.

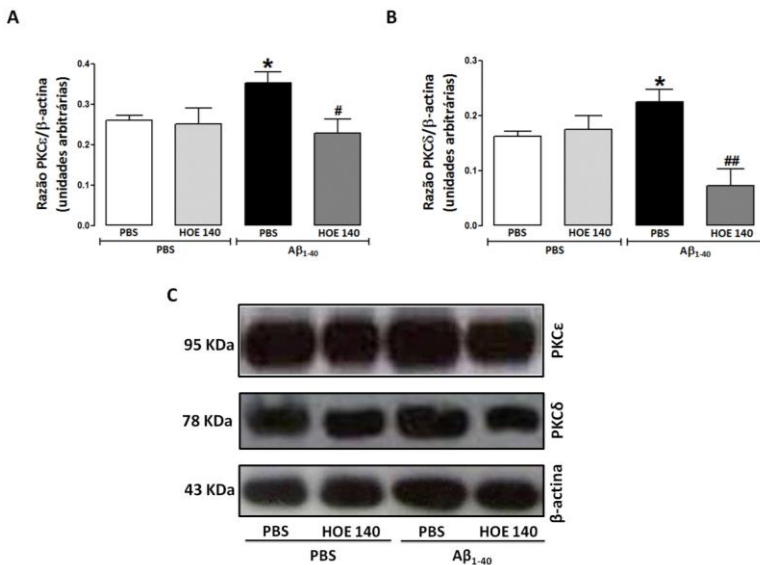


**Figura 25 - O peptídeo  $A\beta_{1-40}$  e o antagonista do receptor  $B_2$  (HOE 140), não promovem alterações na expressão de ERK fosforilada (P-ERK).** Animais foram administrados i.c.v. com  $A\beta_{1-40}$  (400 pmol/camundongo) ou PBS (veículo), e dois grupos foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/camundongo, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . **(A)** Dados médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, da imunodeteção por western blot da P-ERK, corrigidos pelo valor do controle genômico  $\beta$ -actina e comparados com os valores da proteína ERK total, 15 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$ . **(B)** Imagens ilustrativas das bandas obtidas por imunodeteção para a ERK 1 (total) (44 KDa), P-ERK (43 KDa) e para o controle genômico  $\beta$ -actina (43kDa). **(D)** Imagens representativas da imunodeteção por imunistoquímica da p-ERK na sub-região CA3 do hipocampo dos camundongos sacrificados 6 horas após injeção i.c.v. de  $A\beta_{1-40}$ . Os valores estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M. (N = 3-5/grupo).



4.9 *Participação do receptor  $B_2$  e de diferentes isoformas da proteína quinase C (PKC) nas vias de sinalização intracelular envolvidas na toxicidade induzida por  $A\beta_{1-40}$ .*

Com o propósito de averiguar os prováveis alvos envolvidos após a ativação do receptor  $B_2$ , um passo anterior à ativação das MAPKs na cascata de sinalização desencadeada pelo peptídeo  $A\beta$ , avaliamos se a proteína quinase C (PKC) participa deste processo. Para tal fim, dois grupos de animais foram pré-tratados com uma única injeção i.c.v. do antagonista seletivo do receptor  $B_2$ , HOE 140 (50  $\mu\text{mol}$ /camundongo) e outros dois grupos com PBS 2 horas antes da administração i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  (400  $\mu\text{mol}$ /camundongo). Após 15 dias, os animais foram sacrificados e os cérebros removidos para a realização do western blot para a PKC isoforma  $\delta$  (PKC $\delta$ ) e  $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) no hipocampo. Verifica-se na figura 26A e B que os animais que receberam o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  apresentam aumento de 40% na expressão da PKC $\epsilon$  e de 37% para a PKC $\delta$ , respectivamente, quando comparados ao grupo controle (PBS). De modo significativo, o pré-tratamento com o HOE 140 preveniu completamente estas alterações promovidas pela injeção de  $A\beta_{1-40}$  em ambas as isoformas de PKC (figura 26).



**Figura 26 - O pré-tratamento com HOE 140 previne o aumento da expressão das proteínas PKCε e PKCδ induzido pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> em camundongos.** Animais foram administrados i.c.v. com Aβ<sub>1-40</sub> (400 pmol/camundongo) ou PBS (veículo). Alguns grupos foram pré-tratados com o HOE 140 (50 pmol/camundongo, i.c.v.), 2 horas antes do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. Dados médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do western blot para a PKCε (A) e para a PKCδ (B), corrigidos pelo valor do controle genômico β-actina, 15 dias após a injeção de Aβ<sub>1-40</sub>. (C) Imagens representativas das bandas obtidas por imunodeteção para a PKCε (95 KDa), PKCδ (78 KDa) e para o controle genômico β-actina (43kDa). Os valores estão expressos como a média ± E.P.M. (N = 3-5/grupo). \*P < 0,05; quando comparado ao grupo controle (PBS). # P < 0,05; ## P < 0,01; quando comparado ao grupo Aβ<sub>1-40</sub>.

## 5 DISCUSSÃO

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa intimamente associada ao envelhecimento. Os sintomas da doença de Alzheimer parecem ser resultantes do acúmulo de placas compostas pelo peptídeo A $\beta$  no parênquima extracelular do cérebro (GLENNER e WONG, 1984), associado à formação de emaranhados neurofibrilares, como resultado da hiperfosforilação da proteína Tau associada aos microtúbulos no interior dos neurônios (GRUNDKE-IQBAL et al., 1986). Além disso, o acúmulo destes marcadores é normalmente acompanhado pela perda de neurônios, principalmente em áreas corticais hipocâmpais, resultando, conseqüentemente, na perda progressiva das funções cognitivas (SELKOE, 2001).

O estado de agregação do peptídeo A $\beta$  é um fator determinante e crítico na sua toxicidade *in vivo* (PIKE et al., 1991; MATTSO, 1997). Portanto, antes de iniciar qualquer protocolo experimental utilizando o peptídeo, avaliamos o seu estado de agregação. Neste trabalho utilizamos preparações de peptídeo A $\beta_{1-40}$  agregadas, nas quais constatamos a presença de oligômeros. Diferentes tipos de oligômeros têm sido descritos e são normalmente distinguidos pela sua composição, estabilidade e peso molecular (JAN, HARTLEY e LASHUEL, 2010). É importante observar que o termo “oligômeros” abrange estruturas de baixo peso molecular, incluindo dímeros, trímeros e tetrâmeros, e de alto peso molecular, como *A $\beta$ -derived diffusible ligands* (ADDLs) e protofibrilas, os quais provavelmente compõem nossa preparação. Após a confirmação do estado de agregação do peptídeo A $\beta_{1-40}$  foram realizados os testes comportamentais e posteriores análises moleculares.

De acordo com dados anteriores demonstrados por nosso grupo (MEDEIROS et al., 2007; PASSOS et al., 2010; BICCA et al., 2011), a administração i.c.v. do peptídeo A $\beta_{1-40}$  (400 pmol/sítio) agregado, promoveu acentuado declínio cognitivo em camundongos. Nestes estudos anteriores os resultados foram obtidos utilizando como teste de memória o labirinto aquático de Morris, que avalia memória espacial. No presente estudo utilizamos como teste de memória espacial o teste de reconhecimento de objetos, a fim de confirmar os dados anteriores e testar o

efeito do bloqueio do B<sub>2</sub>R sobre o déficit cognitivo causado pela A $\beta$ . Os resultados do presente estudo confirmam e estendem os estudos anteriores, uma vez que demonstram que o tratamento i.c.v. com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> resultou em prejuízos das funções cognitivas em camundongos, avaliadas aqui através do teste de reconhecimento de objetos.

O receptor B<sub>2</sub> (B<sub>2</sub>R) está intimamente relacionado ao processo inflamatório e alguns trabalhos demonstram a sua participação em modelos experimentais da doença de Alzheimer e na consolidação da memória (PREDIGER et al., 2008; AMARAL et al., 2010; LEMOS et al., 2010). No presente estudo nós avaliamos a possível contribuição do B<sub>2</sub>R para as alterações comportamentais induzidas pela administração i.c.v do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> em camundongos, empregando o teste de reconhecimento de objetos. Os resultados comportamentais obtidos no presente trabalho confirmam os resultados anteriores a respeito do papel protetor do bloqueio de B<sub>2</sub>R sobre o déficit cognitivo induzido pela A $\beta$  (PREDIGER et al., 2008), uma vez que o pré-tratamento com o antagonista seletivo deste receptor, o HOE 140, preveniu totalmente o prejuízo cognitivo avaliado neste teste. De fato, alguns trabalhos demonstraram o efeito neuroprotetor de antagonistas dos receptores B<sub>2</sub> no dano cerebral induzido por isquemia ou trauma (GORLACH et al., 2001; DING-ZHOU et al., 2003; IVASHKOVA et al., 2006). Ainda, os dados do presente estudo corroboram estudos prévios, os quais demonstraram que o antagonismo ou a deleção gênica deste receptor melhoraram a função cognitiva de animais tratados com o peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> (PREDIGER et al., 2008). No entanto, AMARAL e colaboradores (2010) sugeriram que a ativação do receptor B<sub>2</sub> poderia ter um papel neuroprotetor, visto que animais nocaute para este receptor apresentaram prejuízo cognitivo após a infusão contínua de A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Os autores propõem como possível explicação para as diferenças encontradas entre os estudos, a divergência de modelos experimentais, e as respostas diferentes deste receptor a injeção contínua ou aguda do peptídeo A $\beta$  (AMARAL et al., 2010).

Um estudo utilizando cultura de células microglias demonstrou uma expressão basal de receptor B<sub>2</sub> nestas células e não de receptor B<sub>1</sub> (NODA et al., 2003), diferentemente das células neuronais que expressam constitutivamente o receptor B<sub>1</sub> (CALIXTO et al., 2004). Baseados nas evidências da literatura citadas anteriormente e nos resultados

comportamentais obtidos neste estudo que mostraram que o pré-tratamento com o antagonista do receptor  $B_2$ , o HOE 140, promoveu uma melhora na função cognitiva dos animais posteriormente tratados com  $A\beta_{1-40}$ , propomos que o peptídeo promoveria a liberação de bradicinina que ativaria o receptor  $B_2$  desencadeando cascatas dependentes deste estímulo que são necessárias para a propagação e manutenção do processo inflamatório. Para confirmar tal hipótese, adotamos um protocolo adicional no qual os animais receberam um tratamento com o HOE 140, 24 h após a administração do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , e posteriormente foram avaliadas as funções cognitivas através do teste do reconhecimento de objetos. Observamos neste protocolo que o tratamento com o antagonista do receptor  $B_2$ , o HOE 140, não promoveu nenhuma melhora na memória dos animais quando injetado 24h após a administração do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . Apoiados neste resultado, sugerimos que, a ativação deste receptor é desencadeada pelo peptídeo  $A\beta$ , sendo necessária para a sua ação citotóxica, visto que o tratamento após o processo de indução da toxicidade desenvolvida pelo peptídeo  $A\beta$  não foi eficaz no teste realizado.

Ainda com a finalidade de confirmar os dados experimentais sobre o papel benéfico do bloqueio do receptor  $B_2$  e objetivando excluir a possível interação entre os peptídeos  $A\beta_{1-40}$  e HOE 140, que poderia resultar de uma ligação física impedindo a ação citotóxica do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , realizamos um segundo protocolo adicional. Neste protocolo os animais foram pré-tratados com três diferentes antagonistas do receptor  $B_2$  por via i.c.v. 2 h antes da administração do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ : o HOE 140, um antagonista peptídico do receptor  $B_2$ ; o NPC 18688, um antagonista pseudopeptídico do receptor  $B_2$  e o FR 173657, um antagonista não peptídico do receptor  $B_2$  e após 14 dias foi realizado o teste do reconhecimento de objetos. Nossos resultados demonstraram que os dois outros antagonistas foram capazes de prevenir o dano cognitivo induzido pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . Com base nestes dados reforçamos nossa hipótese de que a ação citotóxica do peptídeo  $A\beta$  é dependente da ativação deste receptor, e ainda um passo importante para a instalação do processo inflamatório, não dependente da interação entre peptídeos, visto que os antagonistas pseudopeptídico e não peptídico promoveram o mesmo efeito benéfico que o HOE 140 sobre a memória dos animais tratados com  $A\beta_{1-40}$  submetidos ao teste.

Com suporte nos dados comportamentais, os quais sugerem um papel importante para o B<sub>2</sub>R no déficit cognitivo causado pela neuroinflamação, decidimos avaliar a expressão deste receptor 15 dias após o tratamento com o peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>, a fim de avaliar se ocorria aumento na sua expressão. Outros trabalhos já haviam demonstrado o perfil de expressão deste receptor após a injeção única ou infusão contínua de peptídeo Aβ, sustentando a hipótese de que não ocorre alteração em sua expressão no hipocampo (PREDIGER et al., 2008; VIEL et al., 2008). De maneira contrária, demonstramos aqui que uma única injeção do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> foi capaz de induzir aumento na expressão deste receptor no hipocampo 15 dias após sua administração. De modo relevante, demonstramos ainda neste trabalho, a possível auto-regulação do receptor B<sub>2</sub> pelo seu antagonista (HOE 140), que quando administrado antes do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> preveniu o aumento da expressão do seu próprio receptor. Esta regulação pode-se dar de forma direta, ou seja, decorrente da ação do próprio agonista sobre o receptor, modulando mecanismos celulares que induzam a sua expressão. Pode-se ainda sugerir uma regulação indireta, a qual ocorreria devido à inibição do processo inflamatório, como por exemplo, diminuição da liberação de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e cininas) ou redução da expressão de enzimas que contribuem para inflamação, como COX-2, iNOS, ou MAPKs.

A transmissão sináptica é essencial para o funcionamento do sistema nervoso, e as sinapses são consideradas os primeiros alvos da doença de Alzheimer, levando a disfunção sináptica e, conseqüentemente, cognitiva (GOURAS et al., 2010). Portanto, a severidade da doença de Alzheimer está diretamente relacionada com a perda das sinapses (TERRY et al., 1991), sendo que o hipocampo parece ser a região mais afetada em comparação com outras regiões do cérebro (HONER, 2003). Diante disto e, baseados nos resultados dos testes comportamentais, os quais indicaram proteção da cognição pelo antagonismo do receptor B<sub>2</sub>, decidimos avaliar a participação deste receptor sobre o dano sináptico induzido pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. Para tal, analisamos o efeito do HOE 140 sobre a expressão de proteínas pré- e pós-sinápticas, a sinaptofisina e PSD-95, respectivamente. A sinaptofisina é a proteína integrante da vesícula sináptica mais abundante e, portanto, freqüentemente avaliada na tentativa de quantificar sinapses (EDELMAAN et al., 1995). Ademais, a perda progressiva da sinaptofisina

(marcador pré-sináptico) é bem estabelecida em camundongos transgênicos, modelos amplamente utilizados para o estudo da doença de Alzheimer (MUCKE et al., 2000). Verificamos que a injeção de  $A\beta_{1-40}$  reduziu significativamente a expressão da sinaptofisina, conforme demonstrado previamente (PASSOS et al., 2010; BICCA et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2011). De maneira relevante, o antagonismo do  $B_2R$  preveniu esta alteração, sugerindo que o bloqueio das ações da bradicinina nos receptores  $B_2$  possui ação neuroprotetora. Além da sinaptofisina, estudos sugerem que os oligômeros de  $A\beta$  diminuem a expressão/ativação da proteína PSD-95, o que promove a diminuição da responsividade sináptica (DINAMARCA et al., 2008; ROSELLI et al., 2009; CERPA et al., 2011). Portanto, outro marcador avaliado neste trabalho foi a proteína pós-sináptica PSD-95. Nossos resultados demonstram, corroborando dados anteriores do grupo (FIGUEIREDO et al., 2011), que o tratamento com o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  provoca uma diminuição deste marcador no hipocampo dos camundongos. De modo interessante, o bloqueio do  $B_2R$  com o HOE 140 preveniu significativamente tal efeito, quando comparado ao grupo  $A\beta_{1-40}$  tratado com veículo. Em conjunto, os dados comportamentais e moleculares, sugerem que a ativação do  $B_2R$  está relacionada com o dano sináptico, por conseguinte disfunção cognitiva, induzidos pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , e que o bloqueio do receptor  $B_2$  para as cininas possui ação neuroprotetora.

A fase inicial da doença de Alzheimer é caracterizada por um intenso quadro de estresse oxidativo e neuroinflamação, os quais contribuem para a progressão da doença (AKIYAMA et al., 2000; MATTSON, 2004; WYSS-CORAY, 2006). Neste estudo procuramos investigar a participação do receptor  $B_2$  na modulação de diferentes alvos do processo inflamatório como, por exemplo: a ativação microglial, expressão de COX-2, e expressão de enzimas produtoras de NO (nNOS e a iNOS), as quais têm suas expressões aumentadas pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$  (MEDEIROS et al., 2007; MEDEIROS et al., 2010; PASSOS et al., 2010).

McGeer e McGeer (2002) documentaram alterações nas células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e microglia) durante a progressão da doença de Alzheimer, e sugeriram que a  $A\beta$  tem papel central na indução de muitas destas alterações. Além disso, anormalidades nas células gliais podem contribuir para a disfunção sináptica e a morte neuronal, incluindo diminuição da captação glutamatérgica, regulação do cálcio e intensa

produção de citocinas pró-inflamatórias (XU et al., 2001). A ativação das células da glia é considerada um dos primeiros sinais da doença de Alzheimer e parece ocorrer em resposta ao aumento na degeneração das sinapses e dos neurônios, ou pelo acúmulo de placas amilóides no cérebro (WYSS-CORAY, 2006). Ressalta-se que a presença de microglias ativadas e a sua habilidade de potencializar a liberação de substâncias neurotóxicas é interpretada como “neuroinflamação” (AKIYAMA et al., 2000). Portanto, com o intuito de avaliar o envolvimento do B<sub>2</sub>R para as cininas sobre a neuroinflamação induzida por Aβ<sub>1-40</sub>, inicialmente testamos o efeito do pré-tratamento com HOE 140 sobre a expressão de Iba-1, o qual está expresso especificamente nas microglias ativadas. Nossos dados mostram que a injeção de peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> induziu aumento na expressão/ativação de células microgлияis. De maior significância foi a participação do receptor B<sub>2</sub> na regulação destas alterações. Demonstramos neste estudo, pela primeira vez, que o pré-tratamento com o antagonista seletivo do B<sub>2</sub>R preveniu as modificações microgлияis induzidas pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>.

A enzima COX-2, por ser constitutiva, participa tanto de processos fisiológicos quanto de processos patológicos (HOOZEMANS et al., 2001). No sistema nervoso central esta enzima é expressa em populações neuronais específicas, como nos neurônios piramidais, principalmente no córtex e no hipocampo, onde pode modular funções importantes, como por exemplo, o aprendizado e a memória (HOOZEMANS et al., 2001; SIMMONS, BOTTING e HLA, 2004). Sabe-se que os cérebros de portadores da doença de Alzheimer apresentam maior imunomarcagem para a COX-2 quando comparado a pacientes saudáveis (que não apresentavam demência) (HOOZEMANS et al., 2001). Além disso, durante o processo inflamatório induzido pelo peptídeo Aβ ocorre indução da expressão da COX-2 (CAKALA, MALIK e STROSZNAJDER, 2007; MEDEIROS et al., 2010). Nossos resultados corroboram os dados da literatura, uma vez que verificamos aumento da expressão da COX-2 a partir de 1 dia após a injeção de Aβ<sub>1-40</sub>, a qual parece ser sustentada por até 15 dias. Relevantemente, o tratamento com o antagonista do B<sub>2</sub>R, o HOE 140, preveniu significativamente esta alteração induzida pelo peptídeo Aβ<sub>1-40</sub>. Estes dados nos permitem sugerir que o receptor B<sub>2</sub> parece exercer um papel preponderante na modulação da expressão da enzima COX-2.



As diferentes isoformas de NOS contribuem significativamente para o processo inflamatório e para o quadro de estresse oxidativo, pela produção de NO. Estudos relatam o aumento na expressão das três isoformas de NOS (iNOS, nNOS e eNOS) e a produção de peroxinitrito nos cérebros de indivíduos acometidos pela doença de Alzheimer (SMITH et al., 1997; LUTH, MUNCH e ARENDT, 2002; FERNANDEZ-VIZARRA et al., 2004), e que a iNOS pode mediar parte dos efeitos deletérios sobre a cognição induzidos pela  $A\beta_{1-40}$  em roedores (TRAN et al., 2001; MEDEIROS et al., 2007). Adicionalmente, foi demonstrado ainda um aumento na expressão da nNOS após o tratamento com o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em camundongos (FIGUEIREDO et al., 2011). De acordo com os dados prévios, neste trabalho verificamos aumento da expressão das enzimas iNOS e nNOS entre 8 dias e 15 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$ . De maneira importante, o bloqueio de  $B_2R$  preveniu totalmente a indução das enzimas produtoras de NO pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . Evidências experimentais sugerem existir estreita relação entre o peptídeo  $A\beta$ , a expressão da iNOS e o estado redox das células. O NO gerado pela iNOS reage com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) produzindo peroxidonitrito ( $ONOO^-$ ), que exerce efeitos citotóxicos (SMITH et al., 1997). Sugerimos que o aumento da expressão de iNOS e nNOS, pode ser um indicativo de um provável aumento na produção de NO; E sabe-se que o aumento excessivo na produção de EROS contribui com a exacerbação do processo oxidativo e inflamatório e, portanto com o dano celular. Assim podemos inferir que antagonismo do  $B_2R$  seria capaz de modular o processo oxidativo e inflamatório gerado pela  $A\beta$ .

É relevante ressaltar ainda que a citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) não somente está aumentada na doença de Alzheimer como também é considerada um gliotransmissor que afeta as sinapses, a expressão de  $\beta$ -secretase (enzima que cliva APP) e a depuração de  $A\beta$  (DAI et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que o TNF $\alpha$  está envolvido na progressão da inflamação após a administração de  $A\beta_{1-40}$ , ativando vias de sinalização que levam a expressão de iNOS e COX-2 (MEDEIROS et al., 2007; MEDEIROS et al., 2010). A ativação microglial, a qual é uma consequência da deposição de  $A\beta$ , estimula a liberação de TNF- $\alpha$ , a expressão de COX-2 e a produção de radicais livres, como por exemplo, o anion superóxido ( $O_2^-$ ); este último evento está indiretamente associado à ativação das enzimas produtoras de NO. Considerando-se que todos estes eventos são característicos da doença

de Alzheimer (AKIYAMA et al., 2000; COMBS et al., 2001; WYSS-CORAY, 2006), e levando-se em conta as evidências deste bloco de resultados, podemos sugerir que o antagonismo do receptor B<sub>2</sub> bloqueia o processo inflamatório induzido pela injeção i.c.v do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> por diminuir a ativação microglial e, consequentemente, a produção de mediadores pró-inflamatórios por estas células.

Com base nos dados prévios deste estudo, que sugeriram a proteção das alterações inflamatórias pelo antagonismo do receptor B<sub>2</sub>, e sabendo da participação da via das MAPKs na neuroinflamação característica da doença de Alzheimer (ZHU et al., 2001; ZHU et al., 2002), decidimos investigar se o receptor B<sub>2</sub> seria capaz de modular as alterações nesta via de sinalização. A proteína JNK e o seu fator de transcrição o c-Jun são proteínas importantes envolvidas em respostas celulares que podem levar tanto a neurodegeneração, quanto a neuroproteção, dependendo do tipo celular onde são ativadas, ou de outras vias intracelulares ativadas concomitantemente (MIELKE e HERDEGEN, 2000). Estudos mostram que o c-Jun está colocalizado com os neurônios degenerados de portadores da doença de Alzheimer, sugerindo seu envolvimento nesta doença (ANDERSON, SU e COTMAN, 1996). Da mesma forma, a JNK está aumentada e ativada em casos de doença de Alzheimer não-familiar e doença de Alzheimer relacionada ao gene da PSEN1 (SHOJI et al., 2000). Adicionalmente, outra MAPK envolvida na patologia de Alzheimer, e aqui investigada, é a p-38/MAPK, bem como uma de suas proteínas alvo, o fator de transcrição NFκB. Estudos mostram que os níveis de p-38 estão aumentados em cérebros de portadores de Alzheimer (HENSLEY et al., 1999; ZHU et al., 2000; ZHU et al., 2001). De acordo, um estudo demonstrou que células de neuroblastoma da linhagem M17 que foram tratadas com Aβ<sub>1-42</sub> apresentaram aumento na expressão de P-p-38, e quando tratadas com o inibidor desta proteína morreram em menor escala (ZHU et al., 2005).

Corroborando os dados mencionados acima, nosso grupo de pesquisa recentemente demonstrou aumento na expressão e/ou ativação de P-JNK, P-c-Jun e P-p-38, bem como aumento na expressão de p-65/NFκB, após a injeção i.c.v. do peptídeo Aβ<sub>1-40</sub> (MEDEIROS et al., 2007; MEDEIROS et al., 2010). Ainda, Medeiros e colaboradores (2010) mostraram que o pré-tratamento com inibidores de p-38/MAPK e JNK

bloquearam a indução da expressão da enzima COX-2 induzida por A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Adicionalmente, outro estudo evidenciou por técnicas de imunistoquímica e de western blot que ocorreu aumento da expressão de P-JNK e P-p-38 no hipocampo de animais transgênicos TgCRND8, os quais apresentam ativação microglial (GIOVANNINI et al., 2008). Além disso, Zhu e colaboradores (2001) relacionaram a ativação destas proteínas nas fases iniciais da doença de Alzheimer com a indução de estresse oxidativo nos neurônios. É importante destacar que foi proposto anteriormente a existência de um mecanismo de disfunção da LTP induzida por A $\beta$  que depende da expressão/ativação de iNOS e consequente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), via ativação de JNK e p-38 (ROWAN et al., 2004). Esses achados mostram claramente uma associação de fatos que indicam o papel da via das MAPK para a indução da toxicidade causada por A $\beta$ , sendo esse efeito associado à indução de enzimas pró-inflamatórias e oxidativas como a COX-2 e a iNOS. Neste cenário, é importante destacar que no presente estudo o pré-tratamento dos animais com o antagonista seletivo para o B<sub>2</sub>R preveniu significativamente o aumento da expressão/ativação das enzimas P-JNK e P-p-38, bem como de suas proteínas alvo c-Jun e NF $\kappa$ B, respectivamente. Diante disto, podemos propor que a ativação B<sub>2</sub>R contribui para a neuroinflamação e para o estresse oxidativo através da ativação destas vias de sinalização.

Rowan e colaboradores (2004) sugeriram que a indução da expressão/ativação de JNK e p-38, dependia da ação de A $\beta$  sobre alguns alvos de membrana, os quais não foram demonstrados neste estudo (ROWAN et al., 2004). Ainda, Zhu e colaboradores (2001) sugeriram que estas duas proteínas eram ativadas pelo mesmo sinal, visto que o padrão de marcação de P-JNK e P-p38 eram idênticos e estavam colocalizados. Baseados nestes dados da literatura e nos resultados deste estudo, nós propomos que o receptor B<sub>2</sub> poderia ser uma das proteínas alvos de membrana que sensível ao peptídeo A $\beta$  e posteriormente desencadeia uma série de eventos intracelulares culminando com a neuroinflamação.

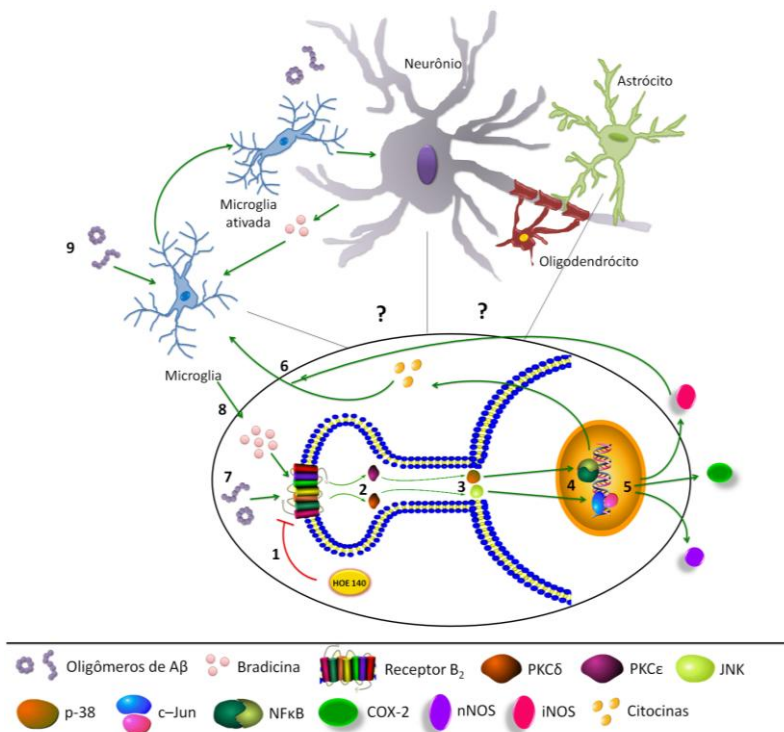
Estudos anteriores realizados em cérebros de portadores de mal de Alzheimer observaram aumento na expressão da ERK quando comparado a pacientes saudáveis (PERRY et al., 1999; ZHU et al., 2001). Ainda, Zhu e colaboradores (2002) sugeriram que a ativação anormal de ERK e suas vias de sinalização no hipocampo, durante a progressão da doença de Alzheimer,

poderiam contribuir para a disfunção ou a perda dos neurônios hipocampus e dessa forma, acarretando o déficit cognitivo observado na doença. Deve-se evidenciar que neste estudo não verificamos a ativação ou aumento da expressão de MAPK/ERK 15 dias após a injeção de  $A\beta_{1-40}$ . Por outro lado, Medeiros e colaboradores (2010) mostraram aumento na expressão desta proteína induzido por  $A\beta_{1-40}$  após 6h. Ressalta-se que o fato de não observarmos a alteração nesta via, não exclui a sua participação na toxicidade induzida por  $A\beta_{1-40}$ , uma vez que é sabido que esta proteína pode ser ativada nas primeiras horas após a injeção deste peptídeo. Portanto, a expressão aumentada de ERK poderia ser um evento não sustentado por até 15 dias, o período em que foi avaliada esta proteína neste estudo.

As PKCs estão envolvidas na indução de vários eventos celulares e síntese de proteínas, além de outros processos importantes no SNC como a remodelagem sináptica, e no aprendizado e memória (NELSON et al., 2008). Estas enzimas atuam modulando a atividade de diferentes MAPKs, como por exemplo a JNK, p-38 e MAPK/ERK. Baseados nestas evidências e nos resultados anteriores envolvendo MAPKs, decidimos avaliar o papel da proteína quinase C (PKC) no mecanismo de ação citotóxica do peptídeo  $A\beta$ , bem como avaliar o envolvimento do  $B_2R$  neste processo. De maneira interessante, Zara e colaboradores (2011) observaram aumento na ativação de PKC isoforma  $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) após a infusão contínua do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . Reforçando a idéia da ativação da PKC, Medeiros e colaboradores (2010) evidenciaram aumento na expressão e na atividade de PKC isoforma  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) após uma única injeção do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . Os resultados do nosso trabalho também sugerem a participação da PKC isoforma  $\delta$  (PKC $\delta$ ) e PKC $\epsilon$  após a injeção i.c.v. do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , uma vez que observamos aumento na expressão destas proteínas quinases nos animais que foram tratados com o peptídeo  $A\beta_{1-40}$  em relação ao grupo controle. De maneira importante, nossos resultados também mostraram que o antagonista do  $B_2R$  (HOE 140) preveniu a ativação de ambas isoformas da PKC induzidas pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ . De grande relevância para o nosso estudo, é sabido que a bradicina estimulando o  $B_2R$  promove a translocação e a ativação de diferentes isoformas de PKC ( $\alpha$ ,  $\epsilon$  e  $\zeta$ ) (ROSS e JOYNER, 1997). Estes dados nos revelam que tanto a PKC $\delta$  quanto a PKC $\epsilon$ , são proteínas alvo ativadas pelo  $B_2R$ , podendo estar relacionadas com as vias de sinalização e os eventos celulares anteriormente descritos neste trabalho.

Avaliados em conjunto os resultados do presente estudo demonstraram que o dano cognitivo causado pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , analisado através do teste de reconhecimentos de objetos, é acompanhado pela perda da viabilidade sináptica, uma vez que também é observada redução nos níveis da proteína formadora de vesícula pré-sináptica, denominada sinaptofisina, e da proteína pós-sináptica PSD-95, nos cérebros dos animais tratados com  $A\beta_{1-40}$ . Adicionalmente, foi demonstrado também que o pré-tratamento i.c.v. com o antagonista seletivo do  $B_2R$ , o HOE 140, preveniu, de maneira significativa, a redução da expressão da sinaptofisina e da PSD-95, bem como preveniu o déficit cognitivo nos animais que receberam uma única injeção do peptídeo  $A\beta_{1-40}$ .

A figura esquemática 27 elucida com mais clareza a possível cascata de eventos. Tais efeitos protetores do HOE 140 parecem estar associados às propriedades do antagonista seletivo de **1.** bloquear o receptor  $B_2$  e impedir **2.** a ativação das proteínas quinases C (isoformas  $\delta$  e  $\epsilon$ ), e posterior **3.** ativação de p-38/MAPK e JNK com conseqüente bloqueio da **4.** ativação de seus fatores de transcrição (p-65/NF $\kappa$ B e c-jun). Estas últimas alterações, estão associadas com o **5.** aumento dos níveis de nNOS, iNOS e COX-2 que parecem contribuir para o estabelecimento do processo inflamatório, resultando na maior **6.** ativação de células microgliais, efeito esse também prevenido pelo HOE 140 (Figura 27). Ainda, não se pode afirmar com certeza se o peptídeo  $A\beta$  poderia **7.** ativar o  $B_2R$  de maneira direta sobre o receptor ou por desencadear **8.** a liberação de bradicinina, **9.** pelas células microgliais ativadas por  $A\beta$ , por exemplo, que atuaria promovendo a ativação de  $B_2R$  e conseqüente ativação da cascata de eventos citada anteriormente e demonstrada na figura 27.



**Figura 27. Mecanismos de ação citotóxica do peptídeo Aβ bloqueados pelo antagonista do receptor B<sub>2</sub> o HOE 140.** O desenho não foi feito de acordo com a escala.

## 6 SUMÁRIO

Os resultados obtidos no presente nos permitiram concluir que:

- O estado de agregação do peptídeo  $A\beta_{1-40}$  foi confirmado através das técnicas de eletroforese em gel nativo de poliacrilamida, microscopia de transmissão eletrônica e cromatografia de exclusão por tamanho, e foram detectados oligômeros de alto peso molecular.
- O bloqueio do receptor  $B_2$  pelo seu antagonista seletivo o HOE 140, promoveu melhora no dano cognitivo induzido por  $A\beta_{1-40}$ , avaliado no teste de reconhecimento de objetos.
- O peptídeo  $A\beta_{1-40}$  induziu a expressão do receptor  $B_2$ , 15 dias após a sua administração, e o HOE 140 foi capaz de modular a expressão deste receptor, avaliados através da técnica de western blot.
- O bloqueio do receptor  $B_2$  através do seu antagonista seletivo o HOE 140, preveniu a perda sináptica induzida pela  $A\beta_{1-40}$ , avaliada através da imunodeteção de sinaptofisina e PSD-95 pelas técnicas de western blot e imunoistoquímica.
- O antagonista seletivo do receptor  $B_2$ , o HOE 140, preveniu a indução do processo inflamatório, bloqueando o aumento na expressão das enzimas COX-2, iNOS e nNOS, bem como a ativação microglial induzida por  $A\beta_{1-40}$ , avaliados através das técnicas de imunoistoquímica e western blot.
- O antagonista seletivo do receptor  $B_2$ , o HOE 140, preveniu a indução da expressão de duas diferentes MAPKs, JNK e p-38, bem como de duas diferentes isoformas de PKC ( $\delta$  e  $\epsilon$ ), induzida pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , avaliados através das técnicas de imunoistoquímica e western blot.





## **7 CONCLUSÕES**

Em conjunto, os dados do presente estudo sugerem que os efeitos benéficos do bloqueio do receptor  $B_2$  sobre a toxicidade induzida pelo peptídeo  $A\beta_{1-40}$ , estão associados com mecanismos anti-inflamatórios. Desta maneira, estes resultados nos permitem sugerir que o receptor  $B_2$  e as vias de sinalização por ele desencadeadas, podem constituir novos alvos para o tratamento farmacológico do processo inflamatório relacionado à doença de Alzheimer.



## 8 ANEXOS

Partes dos resultados da presente dissertação integram um trabalho em fase final de preparação que será submetido à publicação:

**Bicca MA**, Loch-Neckel G, Figueiredo CP, Calixto JB. B2 receptors mediated amyloid- $\beta$ -induced neuroinflammation *in vivo*: Evidence for MAPKs and PKC. (2012).

Além deste trabalho, durante o curso de Mestrado foram desenvolvidos outros estudos que resultaram no aceite para publicação dos seguintes trabalhos:

Figueiredo CP, **Bicca MA**, Latini A, Prediger RD, Medeiros R, Calixto JB. Folic acid plus  $\alpha$ -tocopherol mitigates amyloid- $\beta$ -induced neurotoxicity through modulation of mitochondrial complexes activity. *J Alzheimers Dis.* 2011; 24(1):61-75.

**Bicca MA**, Figueiredo CP, Piermartiri TC, Meotti FC, Bouzon ZL, Tasca CI, Medeiros R, Calixto JB. The selective and competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, (-)-6-phosphonomethyl-decahydroisoquinoline-3-carboxylic acid, prevents synaptic toxicity induced by amyloid- $\beta$  in mice. *Neuroscience.* 2011; 192:631-41.

Dutra RC, de Cezaro de Souza PR, Bento AF, Marcon R, **Bicca MA**, Pianowski LF, Calixto JB. Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Evidence for the underlying mechanisms. *Biochem Pharmacol.* 2012; 83(4):531-42.



## 9 REFERÊNCIAS

AKIYAMA H., BARGER S., BARNUM S., BRADT B., BAUER J., COLE G.M., COOPER N.R., EIKELENBOOM P., EMMERLING M., FIEBICH B.L., FINCH C.E., FRAUTSCHY S., GRIFFIN W.S., HAMPEL H., HULL M., LANDRETH G., LUE L., MRAK R., MACKENZIE I.R., MCGEER P.L., O'BANION M.K., PACHTER J., PASINETTI G., PLATA-SALAMAN C., ROGERS J., RYDEL R., SHEN Y., STREIT W., STROHMEYER R., TOOYOMA I., VAN MUISWINKEL F.L., VEERHUIS R., WALKER D., WEBSTER S., WEGRZYNIAK B., WENK G. e WYSS-CORAY T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 21, 3:383-421, 2000.

ALLSOP D., WONG C.W., IKEDA S., LANDON M., KIDD M. e GLENNER G.G. Immunohistochemical evidence for the derivation of a peptide ligand from the amyloid beta-protein precursor of Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 85, 8:2790-4, 1988.

AMARAL F.A., LEMOS M.T., DONG K.E., BITTENCOURT M.F., CAETANO A.L., PESQUERO J.B., VIEL T.A. e BUCK H.S. Participation of kinin receptors on memory impairment after chronic infusion of human amyloid-beta 1-40 peptide in mice. **Neuropeptides**, 44, 2:93-7, 2010.

ANDERSON A.J., SU J.H. e COTMAN C.W. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. **J Neurosci**, 16, 5:1710-9, 1996.

BICCA M.A., FIGUEIREDO C.P., PIERMARTIRI T.C., MEOTTI F.C., BOUZON Z.L., TASCA C.I., MEDEIROS R. e CALIXTO J.B. The selective and competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, (-)-6-phosphonomethyl-deca-hydroisoquinoline-3-carboxylic acid, prevents synaptic toxicity induced by amyloid-beta in mice. **Neuroscience**, 192:631-41, 2011.

BITAN G., KIRKITADZE M.D., LOMAKIN A., VOLLERS S.S., BENEDEK G.B. e TEPLow D.B. Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, 1:330-5, 2003.

BLENNOW K., BOGDANOVIC N., ALAFUZOFF I., EKMAN R. e DAVIDSSON P. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: relation to severity of dementia, but not to senile plaques, neurofibrillary tangles, or the ApoE4 allele. **J Neural Transm**, 103, 5:603-18, 1996.

BROTHERS H.M., MARCHALANT Y. e WENK G.L. Caffeine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. **Neurosci Lett**, 480, 2:97-100, 2011.

CAKALA M., MALIK A.R. e STROSZNAJDER J.B. Inhibitor of cyclooxygenase-2 protects against amyloid beta peptide-evoked memory impairment in mice. **Pharmacol Rep**, 59, 2:164-72, 2007.

CALIXTO J.B., CABRINI D.A., FERREIRA J. e CAMPOS M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, 87, 1:1-5, 2000.

\_\_\_\_\_. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr Opin Anaesthesiol**, 14, 5:519-26, 2001.

CALIXTO J.B., MEDEIROS R., FERNANDES E.S., FERREIRA J., CABRINI D.A. e CAMPOS M.M. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol**, 143, 7:803-18, 2004.

CERPA W., FARIAS G.G., GODOY J.A., FUENZALIDA M., BONANSO C. e INESTROSA N.C. Wnt-5a occludes Abeta oligomer-induced depression of glutamatergic transmission in hippocampal neurons. **Mol Neurodegener**, 5:3, 2011.

COMBS C.K., KARLO J.C., KAO S.C. e LANDRETH G.E. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. **J Neurosci**, 21, 4:1179-88, 2001.

COTMAN C.W. e BERCHTOLD N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, 25, 6:295-301, 2002.

COUTURE R., HARRISSON M., VIANNA R.M. e CLOUTIER F. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur J Pharmacol**, 429, 1-3:161-76, 2001.

DAI Y., WANG S., TOMINAGA M., YAMAMOTO S., FUKUOKA T., HIGASHI T., KOBAYASHI K., OBATA K., YAMANAKA H. e NOGUCHI K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **J Clin Invest**, 117, 7:1979-87, 2007.

DE FELICE F.G., VELASCO P.T., LAMBERT M.P., VIOLA K., FERNANDEZ S.J., FERREIRA S.T. e KLEIN W.L. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **J Biol Chem**, 282, 15:11590-601, 2007.

DENES A., FERENCZI S. e KOVACS K.J. Systemic inflammatory challenges compromise survival after experimental stroke via augmenting brain inflammation, blood- brain barrier damage and brain oedema independently of infarct size. **J Neuroinflammation**, 8:164, 2011.

DINAMARCA M.C., COLOMBRES M., CERPA W., BONANSO C. e INESTROSA N.C. Beta-amyloid oligomers affect the structure and function of the postsynaptic region: role of the Wnt signaling pathway. **Neurodegener Dis**, 5, 3-4:149-52, 2008.

DING-ZHOU L., MARGAILL I., PALMIER B., PRUNEAU D., PLOTKINE M. e MARCHAND-VERRECCHIA C. LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic brain injury in a murine model of transient focal cerebral ischemia. **Br J Pharmacol**, 139, 8:1539-47, 2003.

DUTRA R.C., DE CEZARO DE SOUZA P.R., BENTO A.F., MARCON R., BICCA M.A., PIANOWSKI L.F. e CALIXTO J.B. Euphol prevents

experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Evidence for the underlying mechanisms. **Biochem Pharmacol**, 2011.

EDELMANN L., HANSON P.I., CHAPMAN E.R. e JAHN R. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. **Embo J**, 14, 2:224-31, 1995.

EL KHOURY J., HICKMAN S.E., THOMAS C.A., CAO L., SILVERSTEIN S.C. e LOIKE J.D. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. **Nature**, 382, 6593:716-9, 1996.

FERNANDEZ-VIZARRA P., FERNANDEZ A.P., CASTRO-BLANCO S., ENCINAS J.M., SERRANO J., BENTURA M.L., MUNOZ P., MARTINEZ-MURILLO R. e RODRIGO J. Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, 15, 2:287-305, 2004.

FERREIRA S.T. e KLEIN W.L. The Abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiol Learn Mem**, 96, 4:529-43, 2011.

FIGUEIREDO C.P., BICCA M.A., LATINI A., PREDIGER R.D., MEDEIROS R. e CALIXTO J.B. Folic acid plus alpha-tocopherol mitigates amyloid-beta-induced neurotoxicity through modulation of mitochondrial complexes activity. **J Alzheimers Dis**, 24, 1:61-75, 2011.

GIOVANNINI M.G., CERBAI F., BELLUCCI A., MELANI C., GROSSI C., BARTOLOZZI C., NOSI D. e CASAMENTI F. Differential activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways in the hippocampus of CRND8 transgenic mouse, a model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, 153, 3:618-33, 2008.

GLENNER G.G. e WONG C.W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem Biophys Res Commun**, 120, 3:885-90, 1984.



GLENNER G.G., WONG C.W., QUARANTA V. e EANES E.D. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. **Appl Pathol**, 2, 6:357-69, 1984.

GOBEIL F., JR., MONTAGNE M., INAMURA N. e REGOLI D. Characterization of non-peptide bradykinin B2 receptor agonist (FR 190997) and antagonist (FR 173657). **Immunopharmacology**, 43, 2-3:179-85, 1999.

GORELICK P.B. Risk factors for vascular dementia and Alzheimer disease. **Stroke**, 35, 11 Suppl 1:2620-2, 2004.

GORLACH C., HORTOBAGYI T., HORTOBAGYI S., BENYO Z., RELTON J., WHALLEY E.T. e WAHL M. Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury. **J Neurotrauma**, 18, 8:833-8, 2001.

GOURAS G.K., TAMPELLINI D., TAKAHASHI R.H. e CAPETILLO-ZARATE E. Intraneuronal beta-amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol**, 119, 5:523-41, 2010.

GRUNDKE-IQBAL I., IQBAL K., TUNG Y.C., QUINLAN M., WISNIEWSKI H.M. e BINDER L.I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83, 13:4913-7, 1986.

HAASS C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. **Embo J**, 23, 3:483-8, 2004.

HARDY J.A. e HIGGINS G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, 256, 5054:184-5, 1992.

HARPER J.D., WONG S.S., LIEBER C.M. e LANSBURY P.T. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. **Chem Biol**, 4, 2:119-25, 1997.

HENSLEY K., FLOYD R.A., ZHENG N.Y., NAEL R., ROBINSON K.A., NGUYEN X., PYE Q.N., STEWART C.A., GEDDES J., MARKESBERY

W.R., PATEL E., JOHNSON G.V. e BING G. p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. **J Neurochem**, 72, 5:2053-8, 1999.

HONER W.G. Pathology of presynaptic proteins in Alzheimer's disease: more than simple loss of terminals. **Neurobiol Aging**, 24, 8:1047-62, 2003.

HOOZEMANS J.J., ROZEMULLER A.J., JANSSEN I., DE GROOT C.J., VEERHUIS R. e EIKELENBOOM P. Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. **Acta Neuropathol**, 101, 1:2-8, 2001.

HUANG H.M., LIN T.A., SUN G.Y. e GIBSON G.E. Increased inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation correlates with an up-regulation of bradykinin receptors in Alzheimer's disease. **J Neurochem**, 64, 2:761-6, 1995.

IRIZARRY M.C., SORIANO F., MCNAMARA M., PAGE K.J., SCHENK D., GAMES D. e HYMAN B.T. Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. **J Neurosci**, 17, 18:7053-9, 1997.

IVASHKOVA Y., SVETNITSKY A., MAYZLER O., PRUNEAU D., BENIFLA M., FUXMAN Y., COHEN A., ARTRU A.A. e SHAPIRA Y. Bradykinin B2 receptor antagonism with LF 18-1505T reduces brain edema and improves neurological outcome after closed head trauma in rats. **J Trauma**, 61, 4:879-85, 2006.

JAN A., HARTLEY D.M. e LASHUEL H.A. Preparation and characterization of toxic Abeta aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. **Nat Protoc**, 5, 6:1186-209, 2010.

JARRETT J.T. e LANSBURY P.T., JR. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? **Cell**, 73, 6:1055-8, 1993.

JONG Y.J., DALEMAR L.R., SEEHRA K. e BAENZIGER N.L. Bradykinin receptor modulation in cellular models of aging and Alzheimer's disease. **Int Immunopharmacol**, 2, 13-14:1833-40, 2002.

JONG Y.J., FORD S.R., SEEHRA K., MALAVE V.B. e BAENZIGER N.L. Alzheimer's disease skin fibroblasts selectively express a bradykinin signaling pathway mediating tau protein Ser phosphorylation. **Faseb J**, 17, 15:2319-21, 2003.

JOSEPH K., SHIBAYAMA Y., NAKAZAWA Y., PEERSCHKE E.I., GHEBREHIWET B. e KAPLAN A.P. Interaction of factor XII and high molecular weight kininogen with cytokeratin 1 and gC1qR of vascular endothelial cells and with aggregated Abeta protein of Alzheimer's disease. **Immunopharmacology**, 43, 2-3:203-10, 1999.

KELLY J.W. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. **Curr Opin Struct Biol**, 8, 1:101-6, 1998.

KOO E.H., LANSBURY P.T., JR. e KELLY J.W. Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96, 18:9989-90, 1999.

KUO Y.M., EMMERLING M.R., VIGO-PELFREY C., KASUNIC T.C., KIRKPATRICK J.B., MURDOCH G.H., BALL M.J. e ROHER A.E. Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. **J Biol Chem**, 271, 8:4077-81, 1996.

LAFERLA F.M., GREEN K.N. e ODDO S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci**, 8, 7:499-509, 2007.

LAMBERT M.P., BARLOW A.K., CHROMY B.A., EDWARDS C., FREED R., LIOSATOS M., MORGAN T.E., ROZOVSKY I., TROMMER B., VIOLA K.L., WALS P., ZHANG C., FINCH C.E., KRAFFT G.A. e KLEIN W.L. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, 11:6448-53, 1998.

LAURSEN S.E. e BELKNAP J.K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **J Pharmacol Methods**, 16, 4:355-7, 1986.

LEMOES M.T., AMARAL F.A., DONG K.E., BITTENCOURT M.F., CAETANO A.L., PESQUERO J.B., VIEL T.A. e BUCK H.S. Role of kinin B1 and B2 receptors in memory consolidation during the aging process of mice. **Neuropeptides**, 44, 2:163-8, 2010.

LEVY-LAHAD E., WASCO W., POORKAJ P., ROMANO D.M., OSHIMA J., PETTINGELL W.H., YU C.E., JONDRO P.D., SCHMIDT S.D., WANG K. e ET AL. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. **Science**, 269, 5226:973-7, 1995.

LIAO J.K. e HOMCY C.J. The G proteins of the G alpha i and G alpha q family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor. **J Clin Invest**, 92, 5:2168-72, 1993.

LIEBMANN C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. **Cell Signal**, 13, 11:777-85, 2001.

LIEBMANN C. e BOHMER F.D. Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. **Curr Med Chem**, 7, 9:911-43, 2000.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. e RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193, 1:265-75, 1951.

LUCHSINGER J.A. e MAYEUX R. Dietary factors and Alzheimer's disease. **Lancet Neurol**, 3, 10:579-87, 2004.

LUCHSINGER J.A., TANG M.X., SHEA S. e MAYEUX R. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. **Neurology**, 63, 7:1187-92, 2004.

LUTH H.J., MUNCH G. e ARENDT T. Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. **Brain Res**, 953, 1-2:135-43, 2002.

MARCEAU F., HESS J.F. e BACHVAROV D.R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol Rev**, 50, 3:357-86, 1998.

MATTSON M.P. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. **Physiol Rev**, 77, 4:1081-132, 1997.

\_\_\_\_\_. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, 430, 7000:631-9, 2004.

MCGEER P.L. e MCGEER E.G. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. **J Neurovirol**, 8, 6:529-38, 2002.

MCLEAN C.A., CHERNY R.A., FRASER F.W., FULLER S.J., SMITH M.J., BEYREUTHER K., BUSH A.I. e MASTERS C.L. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Ann Neurol**, 46, 6:860-6, 1999.

MEDEIROS R., FIGUEIREDO C.P., PANDOLFO P., DUARTE F.S., PREDIGER R.D., PASSOS G.F. e CALIXTO J.B. The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide. **Behav Brain Res**, 209, 1:165-73, 2010.

MEDEIROS R., PREDIGER R.D., PASSOS G.F., PANDOLFO P., DUARTE F.S., FRANCO J.L., DAFRE A.L., DI GIUNTA G., FIGUEIREDO C.P., TAKAHASHI R.N., CAMPOS M.M. e CALIXTO J.B. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. **J Neurosci**, 27, 20:5394-404, 2007.

MERZ P.A., WISNIEWSKI H.M., SOMERVILLE R.A., BOBIN S.A., MASTERS C.L. e IQBAL K. Ultrastructural morphology of amyloid fibrils from neuritic and amyloid plaques. **Acta Neuropathol**, 60, 1-2:113-24, 1983.

MEUCCI E., MORDENTE A. e MARTORANA G.E. Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging. **J Biol Chem**, 266, 8:4692-9, 1991.

MIELKE K. e HERDEGEN T. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. **Prog Neurobiol**, 61, 1:45-60, 2000.

MINGHETTI L. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. **Curr Opin Neurol**, 18, 3:315-21, 2005.

MINGHETTI L., AJMONE-CAT M.A., DE BERARDINIS M.A. e DE SIMONE R. Microglial activation in chronic neurodegenerative diseases: roles of apoptotic neurons and chronic stimulation. **Brain Res Brain Res Rev**, 48, 2:251-6, 2005.

MORGANTI-KOSSMANN M.C., RANCAN M., OTTO V.I., STAHEL P.F. e KOSSMANN T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. **Shock**, 16, 3:165-77, 2001.

MOUNT C. e DOWNTON C. Alzheimer disease: progress or profit? **Nat Med**, 12, 7:780-4, 2006.

MUCKE L., MASLIAH E., YU G.Q., MALLORY M., ROCKENSTEIN E.M., TATSUNO G., HU K., KHOLODENKO D., JOHNSON-WOOD K. e MCCONLOGUE L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. **J Neurosci**, 20, 11:4050-8, 2000.

NAKAMURA S., MURAYAMA N., NOSHITA T., ANNOURA H. e OHNO T. Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. **Brain Res**, 912, 2:128-36, 2001.

NARANG H.K. High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril in Alzheimer's disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, 39, 6:621-31, 1980.

NELSON T.J., SUN M.K., HONGPAISAN J. e ALKON D.L. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. **Eur J Pharmacol**, 585, 1:76-87, 2008.

NODA M., KARIURA Y., AMANO T., MANAGO Y., NISHIKAWA K., AOKI S. e WADA K. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. **Life Sci**, 72, 14:1573-81, 2003.

PASSOS G.F., FIGUEIREDO C.P., PREDIGER R.D., PANDOLFO P., DUARTE F.S., MEDEIROS R. e CALIXTO J.B. Role of the macrophage inflammatory protein-1alpha/CC chemokine receptor 5 signaling pathway in the neuroinflammatory response and cognitive deficits induced by beta-amyloid peptide. **Am J Pathol**, 175, 4:1586-97, 2009.

PASSOS G.F., FIGUEIREDO C.P., PREDIGER R.D., SILVA K.A., SIQUEIRA J.M., DUARTE F.S., LEAL P.C., MEDEIROS R. e CALIXTO J.B. Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in the neuroinflammatory response and cognitive impairments induced by beta-amyloid 1-40 peptide in mice. **Brain Behav Immun**, 2010.

PERRY G., RODER H., NUNOMURA A., TAKEDA A., FRIEDLICH A.L., ZHU X., RAINA A.K., HOLBROOK N., SIEDLAK S.L., HARRIS P.L. e SMITH M.A. Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation. **Neuroreport**, 10, 11:2411-5, 1999.

PETRELLA J.R., COLEMAN R.E. e DORAISWAMY P.M. Neuroimaging and early diagnosis of Alzheimer disease: a look to the future. **Radiology**, 226, 2:315-36, 2003.

PIKE C.J., WALENCEWICZ A.J., GLABE C.G. e COTMAN C.W. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. **Brain Res**, 563, 1-2:311-4, 1991.

POIRIER J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 26, 3:355-61, 2005.

PRAT A., BIERNACKI K., POULY S., NALBANTOGLU J., COUTURE R. e ANTEL J.P. Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. **J Neuropathol Exp Neurol**, 59, 10:896-906, 2000.

PREDIGER R.D., FRANCO J.L., PANDOLFO P., MEDEIROS R., DUARTE F.S., DI GIUNTA G., FIGUEIREDO C.P., FARINA M., CALIXTO J.B., TAKAHASHI R.N. e DAFRE A.L. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav Brain Res**, 177, 2:205-13, 2007.

PREDIGER R.D., MEDEIROS R., PANDOLFO P., DUARTE F.S., PASSOS G.F., PESQUERO J.B., CAMPOS M.M., CALIXTO J.B. e TAKAHASHI R.N. Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, 151, 3:631-43, 2008.

PROUD D. e KAPLAN A.P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. **Annu Rev Immunol**, 6:49-83, 1988.

RACCHI M., IANNA P., BINETTI G., TRABUCCHI M. e GOVONI S. Bradykinin-induced amyloid precursor protein secretion: a protein kinase C-independent mechanism that is not altered in fibroblasts from patients with sporadic Alzheimer's disease. **Biochem J**, 330 ( Pt 3):1271-5, 1998.

REGOLI D. e BARABE J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Rev**, 32, 1:1-46, 1980.

RITCHIE K. e LOVESTONE S. The dementias. **Lancet**, 360, 9347:1759-66, 2002.

ROSELLI F., HUTZLER P., WEGERICH Y., LIVREA P. e ALMEIDA O.F. Disassembly of shank and homer synaptic clusters is driven by soluble beta-amyloid(1-40) through divergent NMDAR-dependent signalling pathways. **PLoS One**, 4, 6:e6011, 2009.



ROSS D. e JOYNER W.L. Resting distribution and stimulated translocation of protein kinase C isoforms alpha, epsilon and zeta in response to bradykinin and TNF in human endothelial cells. **Endothelium**, 5, 4:321-32, 1997.

ROWAN M.J., KLYUBIN I., WANG Q. e ANWYL R. Mechanisms of the inhibitory effects of amyloid beta-protein on synaptic plasticity. **Exp Gerontol**, 39, 11-12:1661-7, 2004.

RUSSO I., AMORNPHIMOLTHAM P., WEIGERT R., BARLATI S. e BOSETTI F. Cyclooxygenase-1 is involved in the inhibition of hippocampal neurogenesis after lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. **Cell Cycle**, 10, 15:2568-73, 2011.

SANTOS D.B., PERES K.C., RIBEIRO R.P., COLLE D., DOS SANTOS A.A., MOREIRA E.L., SOUZA D.O., FIGUEIREDO C.P. e FARINA M. Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid beta peptide in mice. **Exp Neurol**, 233, 2:767-75, 2012.

SATTLER R. e TYMIANSKI M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **J Mol Med**, 78, 1:3-13, 2000.

SAUNDERS A.M., SCHMADER K., BREITNER J.C., BENSON M.D., BROWN W.T., GOLDFARB L., GOLDGABER D., MANWARING M.G., SZYMANSKI M.H., MCCOWN N. e ET AL. Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. **Lancet**, 342, 8873:710-1, 1993.

SCHANSTRA J.P., MARIN-CASTANO M.E., ALRIC C., PESQUERO J.B., CLAIRE M., GIROLAMI J.P. e BASCANDS J.L. Homologous and heterologous induction of the human bradykinin B1-receptor and B1-receptor localisation along the rat nephron. **Immunopharmacology**, 45, 1-3:29-34, 1999.

SELKOE D.J. Amyloid beta protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Cell**, 58, 4:611-2, 1989.

\_\_\_\_\_. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. **Trends Cell Biol**, 8, 11:447-53, 1998.

\_\_\_\_\_. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. **J Alzheimers Dis**, 3, 1:75-80, 2001.

\_\_\_\_\_. Alzheimer's disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 3, 7, 2011.

SHANKAR G.M., LI S., MEHTA T.H., GARCIA-MUNOZ A., SHEPARDSON N.E., SMITH I., BRETT F.M., FARRELL M.A., ROWAN M.J., LEMERE C.A., REGAN C.M., WALSH D.M., SABATINI B.L. e SELKOE D.J. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. **Nat Med**, 14, 8:837-42, 2008.

SHERRINGTON R., ROGAEV E.I., LIANG Y., ROGAEVA E.A., LEVESQUE G., IKEDA M., CHI H., LIN C., LI G., HOLMAN K., TSUDA T., MAR L., FONCIN J.F., BRUNI A.C., MONTESI M.P., SORBI S., RAINERO I., PINESSI L., NEE L., CHUMAKOV I., POLLEN D., BROOKES A., SANSEAU P., POLINSKY R.J., WASCO W., DA SILVA H.A., HAINES J.L., PERKICAK-VANCE M.A., TANZI R.E., ROSES A.D., FRASER P.E., ROMMENS J.M. e ST GEORGE-HYSLOP P.H. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. **Nature**, 375, 6534:754-60, 1995.

SHOJI M., IWAKAMI N., TAKEUCHI S., WARAGAI M., SUZUKI M., KANAZAWA I., LIPPA C.F., ONO S. e OKAZAWA H. JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation. **Brain Res Mol Brain Res**, 85, 1-2:221-33, 2000.

SIEBECK M., SCHORR M., SPANNAGL E., LEHNER M., FRITZ H., CHERONIS J.C. e WHALLEY E.T. B1 kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existing infection. **Immunopharmacology**, 40, 1:49-55, 1998.

SIMMONS D.L., BOTTING R.M. e HLA T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol Rev**, 56, 3:387-437, 2004.

SISODIA S.S. e PRICE D.L. Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. **FASEB J**, 9, 5:366-70, 1995.

SMITH M.A., RICHEY HARRIS P.L., SAYRE L.M., BECKMAN J.S. e PERRY G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. **J Neurosci**, 17, 8:2653-7, 1997.

STRITTMATTER W.J., WEISGRABER K.H., HUANG D.Y., DONG L.M., SALVESEN G.S., PERICAK-VANCE M., SCHMECHEL D., SAUNDERS A.M., GOLDBABER D. e ROSES A.D. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90, 17:8098-102, 1993.

TAKEDA S., SATO N., NIISATO K., TAKEUCHI D., KURINAMI H., SHINOHARA M., RAKUGI H., KANO M. e MORISHITA R. Validation of Abeta1-40 administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease. **Brain Res**, 1280:137-47, 2009.

TERI L., BORSON S., KIYAK H.A. e YAMAGISHI M. Behavioral disturbance, cognitive dysfunction, and functional skill. Prevalence and relationship in Alzheimer's disease. **J Am Geriatr Soc**, 37, 2:109-16, 1989.

TERRY R.D., MASLIAH E., SALMON D.P., BUTTERS N., DETERESA R., HILL R., HANSEN L.A. e KATZMAN R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. **Ann Neurol**, 30, 4:572-80, 1991.

THAMBISETTY M., SIMMONS A., VELAYUDHAN L., HYE A., CAMPBELL J., ZHANG Y., WAHLUND L.O., WESTMAN E., KINSEY A., GUNTERT A., PROITSI P., POWELL J., CAUSEVIC M., KILLICK R., LUNNON K., LYNHAM S., BROADSTOCK M., CHOUDHRY F., HOWLETT D.R., WILLIAMS R.J., SHARP S.I., MITCHELMORE C., TUNNARD C., LEUNG R., FOY C., O'BRIEN D., BREEN G., FURNEY S.J., WARD M., KLOSZEWSKA I., MECOCCHI P., SOININEN H., TSOLAKI M., VELLAS B., HODGES A., MURPHY D.G., PARKINS S., RICHARDSON J.C., RESNICK S.M., FERRUCCI L., WONG D.F.,

ZHOU Y., MUEHLBOECK S., EVANS A., FRANCIS P.T., SPENGER C. e LOVESTONE S. Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. **Arch Gen Psychiatry**, 67, 7:739-48, 2010.

TRAN M.H., YAMADA K., OLARIU A., MIZUNO M., REN X.H. e NABESHIMA T. Amyloid beta-peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. **FASEB J**, 15, 8:1407-9, 2001.

VAN DAM D. e DE DEYN P.P. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. **Nat Rev Drug Discov**, 5, 11:956-70, 2006.

VIEL T.A. e BUCK H.S. Kallikrein-kinin system mediated inflammation in Alzheimer's disease in vivo. **Curr Alzheimer Res**, 8, 1:59-66, 2011.

VIEL T.A., LIMA CAETANO A., NASELLO A.G., LANCELOTTI C.L., NUNES V.A., ARAUJO M.S. e BUCK H.S. Increases of kinin B1 and B2 receptors binding sites after brain infusion of amyloid-beta 1-40 peptide in rats. **Neurobiol Aging**, 29, 12:1805-14, 2008.

WALKER K., PERKINS M. e DRAY A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochem Int**, 26, 1:1-16; discussion 17-26, 1995.

WALLACE J.E., KRAUTER E.E. e CAMPBELL B.A. Animal models of declining memory in the aged: short-term and spatial memory in the aged rat. **J Gerontol**, 35, 3:355-63, 1980.

WALSH D.M., HARTLEY D.M., KUSUMOTO Y., FEZOU Y., CONDRON M.M., LOMAKIN A., BENEDEK G.B., SELKOE D.J. e TEPLow D.B. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. **J Biol Chem**, 274, 36:25945-52, 1999.

WALSH D.M. e SELKOE D.J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. **Neuron**, 44, 1:181-93, 2004.

WANG J., DICKSON D.W., TROJANOWSKI J.Q. e LEE V.M. The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. **Exp Neurol**, 158, 2:328-37, 1999.

WANG X. e LO E.H. Triggers and mediators of hemorrhagic transformation in cerebral ischemia. **Mol Neurobiol**, 28, 3:229-44, 2003.

WESTERMAN M.A., COOPER-BLACKETER D., MARIASH A., KOTILINEK L., KAWARABAYASHI T., YOUNKIN L.H., CARLSON G.A., YOUNKIN S.G. e ASHE K.H. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, 22, 5:1858-67, 2002.

WYSS-CORAY T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? **Nat Med**, 12, 9:1005-15, 2006.

XU J., CHEN S., AHMED S.H., CHEN H., KU G., GOLDBERG M.P. e HSU C.Y. Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. **J Neurosci**, 21, 1:RC118, 2001.

ZEMPEL H., THIES E., MANDELKOW E. e MANDELKOW E.M. Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. **J Neurosci**, 30, 36:11938-50, 2010.

ZHOU X., ZHOU J., LI X., GUO C., FANG T. e CHEN Z. GSK-3beta inhibitors suppressed neuroinflammation in rat cortex by activating autophagy in ischemic brain injury. **Biochem Biophys Res Commun**, 411, 2:271-5, 2011.

ZHU X., CASTELLANI R.J., TAKEDA A., NUNOMURA A., ATWOOD C.S., PERRY G. e SMITH M.A. Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. **Mech Ageing Dev**, 123, 1:39-46, 2001.

ZHU X., LEE H.G., RAINA A.K., PERRY G. e SMITH M.A. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. **Neurosignals**, 11, 5:270-81, 2002.

ZHU X., MEI M., LEE H.G., WANG Y., HAN J., PERRY G. e SMITH M.A. P38 activation mediates amyloid-beta cytotoxicity. **Neurochem Res**, 30, 6-7:791-6, 2005.

ZHU X., ROTTKAMP C.A., BOUX H., TAKEDA A., PERRY G. e SMITH M.A. Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, 59, 10:880-8, 2000.